SERODIAGNOSTIK UND ERREGERIDENTIFIZIERUNG BEI AVIÄREN MYKOBAKTERIOSEN

HELMUT NEUMANN

Disbui. München
1988

UNIV.
LIBRARY
MICH.

Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Josef Kösters
Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. Dr. habil. Helga Gerlach

Serodiagnostik und Erregeridentifizierung bei aviären Mykobakteriosen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Helmut Neumann

aus Neumarkt-St. Veit

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. M. Rüsse
Referent:	Prof. Dr. Dr. habil. H. Gerlach
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. habil. H. Petry

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554823_0110

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literatur	3
2.1	Charakterisierung des Erregers	3
2.2	Mycobacterium avium und Mycobacterium intracellulare	5
2.3	Pathologisch-anatomische Veränderungen	9
2.4	Vorkommen von Mykobakterien	10
2.5	Antigenherstellung	11
2.6	Serotypisierung	12
3	Eigene Untersuchungen	15
3.1	Versuchsplan	15
3.2	Material und Methode	15
3.2.1	Herstellung der Antigene für die Objektträgerschnellagglutination	15
3.2.1.1	Antigenstämme	15
3.2.1.2	Nährböden und Abschwemmflüssigkeiten	16
3.2.1.3	Behandlung der Antigenstämme	17
3.2.1.3.1	Abtötung	17
3.2.1.3.2	Einstellung des Bakterienzellgehalts nach EG-Richtlinien für "Salmonella pullorum" Antigene	17
3.2.2	Herstellung großer Antigenmengen	18
3.3	Herstellung von Antikörpern	19
3.3.1	Mit lebenden Mykobakterien	19
3.3.2	Mit abgetöteten Mykobakterien	19
3.4	Objektträgerschnellagglutination	20
3.5	Langsamagglutination (Gruber-Widal)	20
3.6	Absorption zur Herstellung monovalenter Antikörper	21
3.7	Serotypisierung	21
3.7.1	Herkunft der Feldstämme	21
3.7.2	Serologische Differenzierung der Feldstämme	22

4	Ergebnisse	27
4.1	Antigensuspensionen	27
4.1.1	Kultur der Antigenstämme	27
4.1.2	Behandlung der Antigensuspensionen	27
4.2	Reaktion der Antigensuspensionen mit homologen und heterologen Antikörpern	28
4.3	Objektträgerschnellagglutination mit Patientenseren	31
4.4	Langsamagglutination (Gruber-Widal)	40
4.5	Monovalente Antikörper	39
4.6	Wachstum der Feldstämme und Suspendierung der Isolate	39
4.7	Serotypenbestimmung	42
5	Diskussion	45
6	Zusammenfassung	51
	Summary	52
	Resumen	53
7	Literaturverzeichnis	54
8	Danksagung	65
9	Lebenslauf	66

1 Einleitung

Während die heute übliche Intensivhaltung des Wirtschaftsgeflügels bei der Tilgung der Mykobakteriose eine erhebliche Rolle gespielt hat, ist sie nach wie vor in Zoobeständen und bei Vögeln in Privatbesitz stark verbreitet. Neuere Untersuchungen von FORSTER (1987) belegen, daß die Mykobakteriose auch bei den Psittaciformes häufig vorkommt.

Zur Diagnose der Mykobakterieninfektion am lebenden Vogel stehen u. a. die intrakutane Tuberkulinisierung mit aviären Sensitinen, die beim Haushuhn am Kehllappen vorgenommen wird, sowie die Objektträgerschnellagglutination (OSA) mit Vollblut, Serum bzw. Plasma zur Verfügung. Die Tuberkulinisierung ist als Herdendiagnose anzusehen; das Ausmerzen der Reagenten führt nicht zur Sanierung der Herde. Ein weiteres Problem bei der Tuberkulinprobe ist bei vielen Vogelarten das Fehlen von federfreien Stellen. Die Kloakenschleimhaut, das Augenlid und gegebenenfalls die Schwimmhäute müssen alternativ zur Durchführung der Probe genutzt werden. Insbesondere bei scheuen und schockanfälligen Vögeln stellt das erneute Fangen zum Ablesen der Sensitinreaktion einen erheblichen Streßfaktor dar. Für die Durchführung der OSA ist ein einmaliges Fangen der Tiere ausreichend und die Ergebnisse können noch am selben Tag vorliegen. Die OSA weist außerdem eine höhere Empfindlichkeit auf als die intrakutane Tuberkulinisierung. SCHLIESSER und BERGER (1962) sowie NASSAL (1963) haben nach experimenteller Infektion von Hühnern mit Hilfe der Seroagglutination 93,0 % bzw. 70,7 % mehr Reagenten erfassen können als mit der Allergieprobe. Nach natürlicher Infektion sind im allgemeinen nur 50–60 % der infizierten Tiere mit der intrakutanen Tuberkulinisierung erfaßbar (HARTWIG, 1965).

Früher wurden von der Firma Dr. Rentschler und Co. sowie von den Behringwerken (GÖTZ, 1984) kommerzielle Antigene für die Agglutinationsmethode angeboten. Mit dem Rückgang der Tuberkulose in der Wirtschaftsgeflügelhaltung und der dadurch sinkenden Nachfrage, wurde die Produktion eingestellt. Seit 1976 wird von der Firma Biowet, Polen, ein aus Mycobacterium (M.) avium Serovar 2, bestehendes Standardantigen unter dem Namen Tuberculognost angeboten. Mit diesem Diagnostikum haben DABROWSKI (1977) und SCHRÖDER (1981) erfolgreich gearbeitet. GÖTZ (1984) konnte im Rahmen ihrer Dissertation die Eignung des Tuberculognost als Antigen für die OSA mit Serum bzw. Plasma bestätigen. Von 56 Tieren, die serologisch

reagierten, wurde die Diagnose bei 80,4 % pathologisch-anatomisch, bei 82,1 % bakteriell gesichert.

Es war das Ziel dieser Arbeit, brauchbare Antigene für die OSA und entsprechende Antikörper im Haushuhn herzustellen. Da neben M. avium Serovar 2, das nach Literaturangaben am häufigsten in Europa auftritt, auch M. avium Serovar 1, 3 und M. intracellulare Serovar 4, 6, 8, 9 bei Vögeln und Säugern (einschließlich des Menschen) eine Rolle spielen können, wurden auch diese Antigene in die Untersuchung miteinbezogen. Desweiteren wird eine Übersicht über die Mykobakteriose bei Vögeln in Zooanlagen bzw. in Privatbesitz durch Isolierung des Erregers aus gestorbenen Tieren bzw. anhand serologischer Untersuchungen von Kontakttieren erarbeitet.

2 Literatur

2.1 Charakterisierung des Erregers

Nach der Entdeckung eines Bacteriums als Erreger der Tuberkulose durch Robert Koch 1882, galt zunächst die Ansicht, daß diese Krankheit bei Mensch und Tier durch denselben Keim hervorgerufen wird. RIVOLTA (1889) sowie MAFFUCCI (1890) konnten zeigen, daß unterschiedliche Erreger die Geflügel- und Rindertuberkulose hervorrufen. Erst 1901 hat auch Koch dies akzeptiert.

Die bakteriologische Einordnung der Erreger erfolgte durch Chester 1901 (WAYNE und KUBICA, 1986), wobei das Genus Mycobacterium Lehmann und Neumann die einzige Gattung der Familie Mycobacteriaceae ist. Hierbei handelt es sich um 0,2-0,6 x 1.0-10,0 µm große, grampositive, leicht gekrümmte oder gerade, unbewegliche Stäbchen. Außerdem zeichnet die Bakterien ein hoher Lipidgehalt der Zellwände und dadurch sogenannte Säurefestigkeit aus. Bei einer Bebrütungstemperatur von 37 °C zeigen die Erreger innerhalb von 2 Tagen bis 8 Wochen ein langsames bis sehr langsames Wachstum (WAYNE und KUBICA, 1986).

Die klassische Einteilung der Gattung Mycobacterium (M.) in M. tuberculosis, M. bovis, M. paratuberculosis, M. leprae und sogenannte atypische Mykobakterien wird bei WAYNE und KUBICA (1986) nicht mehr vertreten. Auch bleibt das bis heute weitverbreitete Schema von RUNYON (1974) für die Einteilung der atypischen Mykobakterien, mit M. avium und M. intracellulare als Vertreter der Gruppe III, der langsamwachsenden, nonchromogenen Mykobakterien, unerwähnt (siehe Tabelle 1).

WAYNE und KUBICA (1986) teilen die Spezies des Genus Mycobacterium in langsamwachsende, wie z. B. M. tuberculosis, M. bovis, M. avium und M. intracellulare, und in schnellwachsende ein. Außerdem gibt es einige neudefinierte Spezies, die bei RUNYON (1974) bzw. BLOBEL und SCHLIESSER (1985) noch nicht erwähnt werden.

Tabelle 1 Einteilung der Mykobakterien nach BLOBEL und SCHLIESSER (1985)

Gruppierung anerkannter *Mycobacterium*-Spezies, Stand 1980 (unter Berücksichtigung der Einteilung nach RUNYON 1974)

Gruppen	Wachstum (W) u. besondere Eigenschaften	Spezies	Alte Bezeichnungen bzw. Synonyma
Tuberkulose-komplex	Tuberkuloseerreger, Langsam (W)	*M. africanum*	
		M. bovis	Typus bovinus
		M. microti	*M. muris*, Vole-Bacillus
		*M. tuberculosis**	Typus humanus
Runyon: Gruppe I	Langsam (W), Photochromogen	*M. asiaticum*	
		*M. kansasii**	*M. luciflavum*
		M. marinum	*M. balnei*, *M. platypoecilus*
		M. simiae	*M. habana*
Gruppe II	Langsam (W), Scotochromogen	*M. flavescens**	*M. acapulcensis*
		*M. gordonae**	*M. aquae*
		*M. scrofulaceum**	*M. marianum*, *M. paraffinicum*
		M. xenopi	
Gruppe III	Langsam (W), Nichtchromogen	*M. avium**	Typus gallinaceus
		M. gastri	
		M. haemophilum	
		M. intracellulare	Battey bacillus, *M. brunense*
		M. malmoense	
		*M. nonchromogenicum**	
		M. terrae	Rudish bacillus, *M. novum*
		M. triviale	
		*M. ulcerans**	*M. buruli*
		*M. xenopi**	*M. littorale*, *M. xenopei*
Gruppe IV	Schnell (W)	*M. aurum*	
		*M. chelonei**	*M. abscessus*, *M. borstelense*, *M. fricalmanii*, *M. runyonii*
		M. chitae	
		M. ducalii	
		M. farcinogenes	*Nocardia farcinica* (?)
		*M. fortuitum**	*M. giae*, *M. minetti*, *M. peregrinum*, *M. ranae*, *M. salmoniphilum*
		M. gadium	
		M. gilvum	
		M. komossense	
		*M. neoaurum**	
		M. parafortuitum	*M. diernhoferi* (?)
		*M. phlei**	Grubbe., Timotheebac., *M. moelleri*
		M. senegalense	*Nocardia farcinica* (?)
		*M. smegmatis**	*M. aquae*, *M. butyricum*, *M. friburgensis*, *M. lacticola*
		M. thermoresistibile	
		*M. vaccae**	
Sonstige	Benötigt Wachstoff Kulturell kein W	*M. paratuberculosis*	*M. johnei*
		*M. leprae**	Hansenbac., Leprabac.
		M. lepraemurium	Stefanskybac., Rattenlepraba.

* Spezies, die nach RATLEDGE und STANFORD (1982) eindeutig definiert sind.

2.2 Mycobacterium avium und Mycobacterium intracellulare

WAYNE und KUBICA (1986) beschreiben das M. avium und das M. intracellulare, syn. Battey-Stämme, als unterschiedlich lange Stäbchen, die nach einer Inkubation von 7 oder mehr Tagen meist glatte, gelegentlich rauhe, unpigmentierte Kolonien bilden. Von ANZ und MEISSNER (1972) wird hervorgehoben, daß bei M. avium die glatten Kolonien sowohl transparent als auch opak aussehen können.

Schon KUBICA und JONES (1965) betonten, daß es sowohl "smooth-transparente" (= translucent, T-Kolonie) als auch "smooth-opake" (= domed, D-Kolonie) Wuchsformen gibt.

ANZ und MEISSNER (1972) zeigten, daß bei M. intracellulare Davis, syn. M. intracellulare Serovar 8, sowohl virulente T-Kolonien als auch avirulente D-Kolonien auftreten können.

Nachdem WINN und PETROFF (1933) bei M. avium die glatte, KRAUSE (1958) aber die rauhe Form für hühnervirulent hielten, wurde ferner vermutet, daß innerhalb der glatten Stämme die transparenten pathogen und die opaken apathogen sind. SCHAEFER et al. (1970) stimmten dem zu und stellten darüberhinaus bei ihren Untersuchungen mit rauhen Stämmen fest, daß diese in ihrer Virulenz die pathogene Form der glatten Stämme (T-Kolonie) weit übertreffen. Zusätzlich haben SCHAEFER et al. (1970) bei zwei opaken Stämmen mit dysgonischem Wachstum Virulenz nachgewiesen. Nach ANZ und MEISSNER (1972) sind bei M. intracellulare sowohl die T- als auch die D-Kolonien für Hühner nicht pathogen. Dagegen stellten DUNBAR et al. (1968) durch Untersuchungen an Mäusen bei diesen Virulenzunterschiede fest. Eine Pathogenität von M. intracellulare Davis wurde von KAZDA und DORNETZ-HUBER (1968) durch ihre vergleichenden Untersuchungen an mit M. avium und M. brunense, syn. M. intracellulare Davis (KUBIN et al., 1968), infizierten Haushühnern bestätigt.

Eine genaue Differenzierung zwischen den echten M. avium und den avium-ähnlichen Stämmen ist nach MEISSNER (1960) nicht durchführbar. Die Autorin hielt weder die Unterschiede der Stämme bezüglich ihrer optimalen Wachstumstemperatur, noch den Grad ihrer Isonikotinsäurehydracid (INH)-Resistenz aufgrund des nicht regelmäßigen Auftretens für relevant. Auch anhand verschiedener biochemischer Untersuchungen war eine eindeutige Unterscheidung dieser beiden Mykobakterienspezies für WOLINSKY (1979b) nicht möglich. WAYNE und KUBICA (1986) schlossen sich den Ausführungen der beiden Autoren an, sehen aber in der variablen Hühnervirulenz von M. intracellulare einen Unterschied zu M. avium. Da bei beiden Spezies

avirulente D-Kolonien auftreten können, war die Hühnervirulenz für MEISSNER (1960) kein eindeutiges Unterscheidungsmerkmal. Erst nach Einführung serologischer Untersuchungen, wie der Langsamagglutination, die hauptsächlich auf SCHAEFER et al. (1970) zurückgeht, konnten die aviären Mykobakterien klassifiziert werden.

M. avium läßt sich in zwei Serovare, M. avium Serovar I und M. avium Serovar II, einteilen (WAYNE und KUBICA, 1986). Beide Typen sind hühnervirulent. MARKS et al. (1969) konnten M. avium Serovar II in zwei Subtypen unterteilen. WOLINSKY und SCHAEFER (1973) schlugen deshalb eine neue Nomenklatur für M. avium vor (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2 Einteilung der Mykobakterien nach WOLINSKY und SCHAEFER (1973)

Vorschlag eines Schemas für die Serotypisierung verschiedener Mycobacterium spp.

Spezies	Alte Serotypen-bezeichnung	Neue Serotypen-bezeichnung M. avium complex
M. avium	1, 2, 3	1, 2, 3
M. intracellulare	IV	4
	V	5
	VI	6
	VII	7
	Davis	8
	Watson	9
	IIIa	10
	IIIb	11
	Howell	12
	Chance	13
	Bonne	14
	Dent	15
	Yandle	16
	Wilson	17
	Altman	18
	Darden	19
	Arnold	20
M. scrofulaceum	Scrofulaceum	41
	Lunning	42
	Gause	43

Darin werden M. avium Serovar I und II (mit seinen beiden Subtypen) als M. avium Serovar 1, 2 und 3 bezeichnet. Nach WAYNE und KUBICA (1986) besitzt M. avium Serovar 2 eine höhere Pathogenität für Hühner als M. avium Serovar 1 und 3. Eine Klassifizierung der auch als Intermediärgruppe von M. intracellulare bezeichneten Stämme der Serovare III, IV, V, VI, Davis und Watson ist noch nicht befriedigend gelöst. Hierbei handelt es sich nach WAYNE und KUBICA (1986) um atypische Mykobakterien, die dem M. intracellulare zugeordnet werden, deren pathogene Eigenschaften aber mehr dem M. avium entsprechen. Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist M. intracellulare Davis, syn. M. avium Serovar 8 (WOLINSKY, 1979a), der früher als M. brunense (KUBIN et al., 1968) bezeichnet wurde.

ANZ et al. (1970) sprachen sich aufgrund der Ergebnisse von Hauttesten an mit Intermediärstämmen sensibilisierten Meerschweinchen, die simultan mit M. avium- und M. intracellulare-Sensitin injiziert wurden, dafür aus, daß die Intermediärgruppe - pathogen oder nicht - der Spezies M. avium zuzuordnen ist.

Schon MEISSNER (1960) forderte aufgrund von Virulenzuntersuchungen bei sogenannten atypischen Mykobakterien, daß diese nicht mehr als M. avium-ähnlich, sondern als M. avium mit geringerer Tiervirulenz betrachtet werden.

Nach WOLINSKY (1979b) sollten M. avium, M. intracellulare und die Intermediärgruppe M. intracellulare III, IV, V, VI, Davis und Watson entweder als M. avium-intracellulare oder als M. avium complex bezeichnet werden (siehe Tabelle 3).

Auch KUBICA und WAYNE (1984) sprechen vom M. avium complex mit Serovar 1-23, weil sich ihrer Meinung nach die Stämme nicht eindeutig unterscheiden lassen.

Tabelle 3 Einteilung der Mykobakterien nach WOLINSKY (1979b)

Durch Agglutination anerkannte Serotypen von Mykobakterien

Komplex oder Spezies	Typen (numeriert)	Typen (Name oder alte Nr.)
M. avium complex		
"Avium"-Typen	1, 2, 3	M. avium I, II, III
"Intracellulare"-Typen	4	IV
	5	V
	6	VI
	7	VII
	8	Davis
	9	Watson
	10	III a
	11	III b
	12	Howell
	13	Chance
	14	Boone
	15	Dent
	16	Yandle
	17	Wilson
	18	Altman
	19	Darden
	20	Arnold
	21, 22	Brockett (RD)*
	23	
	24, 25	Cox (RD)*
	26	
	27	Harrison (RD)*
	28	
"scrofulaceum" types	41	scrofulaceum
	42	Lunning
	43	Gause
	44***	Cole (GRW)**
M. gordonae	1	Kowal (GRW)**
	2	Marshall (GRW)**
	3	Szent (GRW)**
	4	Puntal (GRW)**
	5	Moore (GRW)**
	6	Lanton (GRW)**
	7	Brown (GRW)**
M. marinum	1, 2 (GRW)**	
M. fortuitum	1	M. peregrinum
	2	
M. chelonei	homogen	M. abscessus
M. szulgai	homogen	
M. kansasii	homogen	

* RD : Typen beschrieben von Reznikov und Dawson
** GRW : Typen beschrieben von Goslee, Rynearson und Wolinsky
*** : Es gibt Beweise, daß die Stämme vom Typ 44 antigenmäßig dem M. avium complex Typ 27 entsprechen. Wenn sich dies bestätigt, wird die Bezeichnung Typ 44 zurückgezogen.

2.3 Pathologisch-anatomische Veränderungen

Nach NIEBERLE und COHRS (1961) treten im Verlauf der Tuberkulose mehrere Phasen auf, die jedoch nicht alle durchlaufen werden müssen und bei manchen Tierarten nicht vollständig entwickelt werden. Mykobakterien sind ausgesprochene Mesenchymschmarotzer und wirken nur dort pathogen, wo ein Eindringen in gefäßhaltiges Bindegewebe oder retikuläres Gewebe möglich ist. Erst nach Läsionen der Epithelschicht können die Keime durch Mikro- oder Makrophagen in das Corium oder in die Propria mucosae verschleppt und dort wirksam werden. Es entwickelt sich eine herdförmige Entzündung, die zusammen mit dem Befall der zugehörigen Lymphknoten auftritt und als Primärkomplex bezeichnet wird. Bei Vögeln spricht man aufgrund fehlender Lymphknoten von einem unvollständigen Primärkomplex. Die Mykobakterien werden entweder bindegewebig abgekapselt und können dabei über Jahre infektiös bleiben, oder gelangen auf lymphogenem bzw. hämatogenem Weg in den Kreislauf und führen zu einer Frühgeneralisation mit Absiedlung der Keime in verschiedene Organe, wie Leber, Milz, Knochenmark, Lunge (GRATZL und KÖHLER, 1968, BLOBEL und SCHLIESSER, 1985).

Nach NIEBERLE und COHRS (1961) ist beim Haushuhn der Verdauungstrakt Sitz des unvollständigen Primärkomplexes. Abweichend von den Verhältnissen bei Säugern kommt es bei Vögeln in sehr viel geringerem Maße zu Herdnekrosen mit anschließender Mineralisation. Histologisch zeigen sich bei Vögeln häufig massenhaft mit Mykobakterien angeschoppte Epitheloidzellen. Die Riesenzellproliferationen sind hauptsächlich vom Fremdkörpertyp. Langhans'sche Riesenzellen kommen nur selten vor. Dies liegt vermutlich daran, daß bei Vögeln kaum Nekrosen auftreten, mit denen die Langhans'schen Riesenzellen in der Regel vergesellschaftet sind.

Im Gegensatz zu anderen Tuberkuloseformen ist die aviäre Tuberkulose durch Verbindung mit dem Darmlumen offen. Mykobakterien aus Darm, Leber und Galle werden mit dem Kot ausgeschieden.

Die Inkubationszeit von mehreren Wochen bis Monaten ist von der Expositionsdauer, der Keimmenge und der Kondition der Vögel abhängig.

Außerhalb des Wirtes können die Bakterien in Käfigen und Volieren ohne Naturboden 5 Monate überleben. Als Desinfektionsmittel gibt die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft laut Liste (1987) Lysovet PA^{R} und Tegedor 73^{R} in 3%iger Lösung mit 6 h Einwirkungszeit an.

2.4 Vorkommen von Mykobakterien

M. avium und M. intracellulare kommen ubiquitär vor, wobei Serovar 3 anscheinend nur in Europa anzutreffen ist (WAYNE und KUBICA, 1986). In den USA wird vorwiegend M. avium Serovar 1 als Erreger der Geflügeltuberkulose angesehen (MONTALI et al., 1983; THOEN, 1984). In der Bundesrepublik Deutschland sollen nach SCHLIESSER (1976) hauptsächlich M. avium Serovar 2 und 3 auftreten. Außer bei Vögeln rufen M. avium und M. intracellulare tuberkulöse Veränderungen auch bei Säugetieren und beim Menschen hervor, die als atypische Mykobakteriosen bezeichnet werden (BLOBEL und SCHLIESSER, 1985).

Unter den Säugetieren ist am häufigsten das Schwein betroffen. Bei einer Erkrankung kommt es, bedingt durch den alimentären Infektionsweg, zu lokalen Veränderungen in den Lymphknoten des Verdauungstraktes (BLOBEL und SCHLIESSER, 1985; WAYNE und KUBICA, 1986). Als Infektionsquelle zieht SCHLIESSER (1976) in erster Linie einen Kontakt mit tuberkulösen Hühnern in Betracht. KAUKER und RHEINWALD (1972), BEERWERTH und KESSEL (1976) sehen das Reservoir in kontaminiertem Futter und Sägemehl. Krankheitsfälle ohne Kontakt mit Hühnern sind auf verschiedene Serovare von M. intracellulare aus der Umwelt zurückzuführen (SCHLIESSER, 1976). In diesem Zusammenhang zeigten KAZDA und HOYTE (1972), daß z. B. M. intracellulare Serovar 8 von Grasfröschen (Rana temporaria) bis zu 5 Monaten beherbergt und ausgeschieden wird, ohne daß diese selbst erkranken.

PATTYN (1968) machte darauf aufmerksam, daß aus Schweinelymphknoten isolierte Stämme von M. avium Serovar 1 ihre Virulenz gegenüber Hühnern verloren haben. Dies trifft auch für aus menschlichen Lymphknoten angezüchtete Erreger zu (ANZ et al., 1970).

Beim Rind können auf alimentärem Weg, abhängig von Infektionsdosis und Expositionsdauer (KNORPP, 1961), Veränderungen in den Darmlymphknoten auftreten. Auch hier werden von NASSAL und MUSER (1961), SCHLIESSER (1972, 1976) und WEBER et al. (1976) hauptsächlich infizierte Hühner als Infektionsquelle angesehen. FREERKSEN und LAUTERBACH (1960) und SCHLIESSER (1976, 1978) sehen daher die Möglichkeit, daß es durch Aufnahme von atypischen Mykobakterien zu einer Sensibilisierung der Rinder kommt. Dadurch können bei der routinemäßigen Tuberkulosekontrolle sensibilisierte Rinder falsch-positive Reaktionen mit bovinem Tuberkulin aufweisen und den Status der Tbc-Freiheit des Rinderbestandes gefährden. Diese Kreuzreaktionen treten nach SCHLIESSER (1967) sowie BLOBEL und SCHLIESSER (1985) nur temporär auf.

Selten sind durch M. avium hervorgerufene Tuberkulosefälle bei Katzen, Hunden, Schafen, Ziegen, Pferden sowie exotischen Huftieren (KUBICA und WAYNE, 1984).

HOLMBERG et al. (1986) stellten in einem Primatenzentrum während eines Zeitraums von 8 Jahren gehäuft Viszeraltuberkulose bei Rhesusaffen fest. Als Erreger wurden M. avium Serovar 1, 2 und M. intracellulare Serovar 4, 8, 18 isoliert.

Obwohl der Mensch gegenüber M. avium-Infektionen relativ unempfindlich ist (KARLSON, 1978; SCHLIESSER 1978), können bei Vorliegen prädisponierender Faktoren (SCHLIESSER, 1978; MORGENSTERN und LOBSIGER, 1987) Erkrankungen auftreten. Als Eintrittspforte für die Mykobakterien halten BLOBEL und SCHLIESSER (1985) sowohl den aerogenen als auch den alimentären Weg mit Befall der entsprechenden Organe bzw. Lymphknoten für möglich. M. avium soll nach FORSTER et al. (1988) auch beim Menschen eine Viszeraltuberkulose hervorrufen können. Die Antibiogramme von aus Menschen isolierten aviären Mykobakterienstämmen zeigen eine hohe Resistenz gegenüber den üblicherweise verwendeten Tuberkulostatika. Außerdem sind keine Untersuchungen über die Wirksamkeit von Arzneimitteln gegen die durch M. avium ausgelöste Viszeraltuberkulose beim Menschen bekannt. Nach SCHAEFER (1967), PATTYN und PORTAELS (1972) und WAYNE und KUBICA (1986) werden beim Menschen durch M. intracellulare-Infektionen hauptsächlich Lunge und regionale Lymphknoten befallen. Auch KOVACS (1962) führte die bei den Einwohnern Westaustraliens stark verbreitete Lungentuberkulose auf Serovare von M. intracellulare zurück.

2.5 Antigenherstellung

Mit Antigensuspensionen werden mittels der Objektträgerschnellagglutination humorale Antikörper im Vollblut, Serum oder Plasma nachgewiesen. Hierbei wird jeweils ein Tropfen Antigen mit Vollblut bzw. Serum oder Plasma auf einem Objektträger durch Schwenken vermischt. Als Antigen-Antikörper-Reaktion treten innerhalb weniger Sekunden flockige Agglutinate mit klarem Hintergrund auf (GÖTZ, 1984).

Neben amerikanischen und russischen Autoren sind sich HILLER (1961), BERGER (1962), NASSAL (1963) und RICHTER (1965) einig, daß die Schnellagglutination eine höhere Treffsicherheit als die Tuberkulin-Kehllappenprobe beim Huhn aufweist. Dies wurde auch durch Untersuchungen

an Zoovögeln von VIZY et al. (1964) und GÖTZ (1984) bestätigt, deren pathologisch-anatomische Befunde mit den serologischen Ergebnissen fast immer übereinstimmten.
STOLL und LUCAS (1963) und BETKE et al. (1964) halten dagegen die gleichzeitige Anwendung beider Methoden für sinnvoll.
Die Herstellung stabiler Antigene für die Schnellagglutination ist schwierig. Viele Stämme neigen nach Suspendierung zur Spontanagglutination. Außerdem kann es durch Schädigung der Antigenstruktur zur Verklumpung der Mykobakterien kommen (VIZY et al., 1964).
MOSES et al. (1943) konnten nur zwei ihrer acht Antigenstämme für die Serumschnellagglutination verwenden. Auch bei KARLSON et al. (1950) blieben von 40 nur fünf Stämme für die Vollblutschnellagglutination übrig. Bei PROCHOROV (1958) ließen sich von 130 Stämmen eine, bei HILLER (1961) von 25 drei, bei NASSAL (1963) von 345 zwei und bei BETKE (1964) von 25 drei stabile Antigensuspensionen ohne Autoagglutination gewinnen. Durch Zugabe von Tween 80 in einer Konzentration von 0,05-1 % verminderten HILLER (1961), sowie MATSUI und KAWANISHI (1971), GADEN (1976) und GÖTZ (1984) die Neigung der Stämme zu Spontanagglutinationen.
Bei GÖTZ (1984) waren sechs von sechs aus Schweinelymphknoten isolierte Stämme geeignet. Im Gegensatz zu den übrigen Autoren hat GÖTZ (1984) nicht mit Vollblut oder Serum, sondern mit Citratplasma gearbeitet. Heparinplasma war aufgrund häufiger Schlierenbildung nicht brauchbar. Citratblut wurde gewonnen, weil das Sediment für weitere kulturelle Untersuchungen besser geeignet war. Außerdem wird bei gleichem Ausgangsvolumen mehr Plasma als Serum gewonnen. Dies spielt bei serologischen Untersuchungen von kleinen Vogelarten eine Rolle.
Alle Autoren sind sich einig, daß die Schnellagglutination für die Untersuchung von Herden bzw. Einzeltieren die Methode der Wahl ist. Einerseits ist dieses Verfahren schonender, weil die Tiere für die Diagnose nur einmal gefangen werden müssen, andererseits liefert die OSA schnellere Untersuchungsergebnisse.

2.6 Serotypisierung

Da weder kulturelle Merkmale, biochemische Untersuchungen, Medikamentenempfindlichkeit, noch Tierpathogenität (WAYNE und DOUBEK, 1963, PATTYN und PORTAELS, 1972, WIESMANN, 1982, WAYNE und KUBICA, 1986)

eine Identifizierung der Stämme zulassen, wurde nach einem geeigneteren Verfahren gesucht.

Nach BÖNICKE (1967) ist die Klassifizierung der atypischen Mykobakterien aufgrund ihrer Pigmentierung durch Gruppenüberschneidungen ungenau. Er hielt seine Einteilung nach der "Amidreihe" für geeigneter. Trotz der besseren Klassifizierung der Mykobakterien durch das Amidasespektrum können nahestehende Stämme, wie z. B. M. avium und avium-ähnliche, nicht unterschieden werden.

Erst durch serologische Untersuchungen - Komplementbindungsreaktion oder Agglutination - wurde es möglich, die Serovare von M. avium und M. intracellulare zu unterscheiden (SCHAEFER, 1965, 1967). Die Methoden der Seroagglutination für Mykobakterien lassen sich auf SCHAEFER (1965, 1967) zurückführen. Hierbei reagieren Antigene mit spezifischen Suchantiseren bei 37 °C. Nach 3 h bzw. 20 h werden die Reaktionen abgelesen und die überprüften Antigene den entsprechenden Serovaren zugeordnet. Nach SCHAEFER (1965) und ANZ et al. (1969) ist für die eindeutige Zuordnung zu einem Serovar eine erneute Langsamagglutination mit mindestens einem weiteren Immunserum desselben Serovars notwendig. Dieses zweite Serum muß aber aus einem anderen Stamm hergestellt worden sein.

SAITO und KUBICA (1968) konnten mit dieser Methode 176, ANZ und MEISSNER (1969) 155 Mykobakterienstämme aus Mensch und Tier den entsprechenden Serovaren zuordnen. PATTYN (1970) benutzte dieses Verfahren zur Serotypisierung vieler Stämme schnellwachsender Mykobakterien (Gruppe IV nach Runyon). KUBIN et al. (1969) bewiesen auf diese Weise die Identität von M. brunense und M. intracellulare Serovar Davis. NEUMEIER (1974) wies ein häufiges Auftreten von M. avium außer bei Vögeln auch bei Rindern und Schweinen nach. YODER und SCHAEFER (1971) stellten durch Vergleich von Seroagglutinationen mit dem Meerschweinchenpathogenitätsversuch fest, daß M. avium von beiden Methoden übereinstimmend angezeigt wird. Dagegen ergaben sich bei der Identifizierung von M. intracellulare durch das Auftreten von pathogenen und apathogenen Stämmen größere Abweichungen.

Die Schaefer'sche Langsamagglutinationsmethode verbesserten SONNTAG et al. (1976) durch die Verwendung eines Mikrotitersystems. Hierdurch reduzierte sich der Zeit- und Materialaufwand beträchtlich. Bei ENGEL und BERWALD (1970) zeigte die Überprüfung von 800 Antigenen mit der Langsamagglutination und der OSA übereinstimmende Ergebnisse.

Die Spezifität der Seroagglutination kann durch das Auftreten von Spontanagglutinationen sowie Kreuzreaktionen der Antigene untereinander stark

beeinträchtigt werden. Wie bereits erwähnt, lassen sich Spontanagglutinationen durch Zugabe von Tween 80 deutlich vermindern.
Schon SCHAEFER (1965) eliminierte durch Absorption der Antiseren die störenden Kreuzreaktionen. Castelliani bekam durch Absättigung mit dickflüssigen bis pastösen Bakteriensuspensionen monovalente Seren (WINKLE, 1979). Die benötigte Bakterienmenge ist dabei von der Serumverdünnung abhängig.

GADEN (1976) und HEUGEMÜHLE (1980) absorbierten ihre Immunseren mit Antigenen, die durch Zentrifugieren konzentriert wurden, 30 min im Schüttler bei Zimmertemperatur, wobei die Volumenmenge des Serums dem des Absorbens entsprach.
ANZ et al. (1969) schlagen einen Absättigungsversuch vor, der auf SCHAEFER (1967) zurückgeht. Hierbei werden die gleichtitrigen Immunseren zu gleichen Teilen mit dickflüssigen Mykobakteriensuspensionen des gesuchten Stammes vermischt. Nach 24 h wird zentrifugiert und der Überstand mit Pufferlösung auf die ursprüngliche Menge aufgefüllt. Anschließend wird jedes Serum mit seinem homologen Antigen titriert und die Reaktion nach 24 h abgelesen. Das Immunserum, das mit seinem homologen Antigen den niedrigeren Titer aufweist, entspricht dem Serovar des gesuchten Stammes. Dieser hat neben heterologen auch homologe Antikörper absorbiert und somit einen Titerabfall verursacht.
Eine weitere Möglichkeit der Serotypisierung von Mykbakterien bietet die Immunofluoreszenz. JONES et al. (1965), BENNEDSEN (1966, 1968), GILLISEN (1968) und MARTINS et al. (1973) setzten sich mit diesem Nachweisverfahren auseinander. Gegenüber der Methode nach SCHAEFER (1965) spielen Autoagglutinationen dabei keine Rolle (WOLINSKY, 1979). Aber auch hier stören die Kreuzreaktionen zwischen den Antiseren von M. avium und anderen Vertretern der Gruppe III nach Runyon. Durch hochtitrige Immunseren gelang es den Autoren das Problem der Kreuzreaktionen zu lösen.
In der Humanmedizin werden seit kurzem der Solid-Phase Radioimmunoassay (SPRIA) und der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Nachweis von Antikörpern eingesetzt. So wurden beispielsweise Antikörper gegen eine Zellinhaltsfraktion von M. tuberculosis in Seren tuberkulöser Patienten im Vergleich zu Seren gesunder Kontrollpersonen bestimmt. Der SPRIA wies in diesem Zusammenhang eine höhere Spezifität auf als der ELISA, da mit dem SPRIA 92 %, mit dem ELISA dagegen nur 73 % aller tuberkulösen Patienten erfaßt werden konnten (MAUCH et al., 1988).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Versuchsplan

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden geeignete Antigensuspensionen von M. avium und M. intracellulare zur Diagnose der Geflügeltuberkulose mittels der Objektträgerschnellagglutination (OSA) hergestellt. Verglichen wurden Antigensuspensionen von sieben Laborstämmen, die auf drei verschiedenen Nährböden angezüchtet, mit zwei unterschiedlichen Puffern abgeschwemmt und durch Wärmeeinwirkung abgetötet wurden. Die Agglutination der Antigensuspensionen wurde sowohl an selbsthergestellten Antikörpern, als auch an Seren bzw. Plasmen von mit Mykobakterien infizierten Vögeln untersucht.

Im zweiten Teil wurden aus Organen von 101 an Mykobakteriose erkrankten Vögeln die Erreger angezüchtet und die Isolate mit selbsthergestellten, monovalenten Antikörpern in einer Langsamagglutination typisiert.

3.2 Material und Methode

3.2.1 Herstellung der Antigene für die Objektträgerschnellagglutination

3.2.1.1 Antigenstämme

Als Antigene wurden sieben Laborstämme* von M. avium und M. intracellulare verwendet (WAYNE und KUBICA, 1986).

–	M. avium	Serovar 1
–	M. avium	Serovar 2
–	M. avium	Serovar 3
–	M. intracellulare	Serovar 4
–	M. intracellulare	Serovar 6
–	M. intracellulare	Serovar 8
–	M. intracellulare	Serovar 9

Die sieben Serovare wurden auf drei verschiedene Nährböden, pro Stamm sechs Röhrchen von jedem Nährmedium, überimpft und im Brutschrank bei 42 °C Temperatur drei bis vier Wochen bebrütet.

---

* Die sieben Laborstämme, sowie weitere sieben Stämme der gleichen Serovare, aber verschiedener Herkunft, wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Schröder aus dem Forschungsinstitut Borstel, Institut für experimentelle Biologie und Medizin, zur Verfügung gestellt

3.2.1.2 Nährböden und Abschwemmflüssigkeiten

Für die Anzüchtung der Keime wurden zum Vergleich drei Nährböden in mehrfachem Ansatz verwendet:

- Löwenstein-Jensen Eiernährboden**
- Tarschis-Blutagar**
- Middlebrook 7H10 Agar mit Middlebrook OADC Enrichment***

Es wurden Wachstumsfähigkeit der Keime, Aussehen der Kolonien und die Ablösbarkeit der Keime vom Nährboden beurteilt.
Zur Suspendierung der Bakterien dienten zwei Flüssigkeiten, erstens eine physiol. Kochsalzlösung mit 0,5 % Phenol und 0,5 % Tween 80 (GÖTZ, 1984) und zweitens der Phosphatpuffer nach ANZ et al. (1969). Dieser wird wie folgt hergestellt: Lösung von 14,2 g Na_2HPO_4 wasserfrei und 80,0 g NaCl in 1000 ml Aqua dest., Einstellen des pH auf 6,5, Abfüllen zu 100 ml und anschließende Sterilisation (10 min bei 120 °C). Vor Gebrauch wurde die Lösung 1 : 10 mit Aqua dest. verdünnt, ein End-pH von 7,0 eingestellt und mit Phenol bis zur Endkonzentration von 0,5 % versetzt.
Zeigte sich drei bis vier Wochen nach dem Beimpfen der verschiedenen Nährböden ein dichter Bakterienrasen, wurde zunächst eine Passage angelegt und die Bakterien vergleichend sowohl mit der Kochsalzlösung nach GÖTZ (1984) als auch mit dem Phosphatpuffer nach ANZ et al. (1969) abgeschwemmt. Dazu wurden die Mykobakterien zunächst vorsichtig vom Agar abgelöst, mit der entsprechenden Flüssigkeit suspendiert, und die Suspensionen der einzelnen Serovare in 100 ml Erlenmeyerkolben überführt, die Glasperlen enthielten, und 60 min im Rüttler homogenisiert.
Da sieben Antigenstämme auf drei verschiedenen Nährmedien angezüchtet und zwei verschiedene Puffer benutzt wurden, standen 42 Antigensuspensionen zur Verfügung.

** Für die Bereitstellung der beiden Nährböden, Tarschis-Blutagar und Löwenstein-Jensen Eiernährboden, danke ich dem Tbc-Labor des Landesuntersuchungsamtes für das Gesundheitswesen in Südbayern

*** Firma Difco, Hamburg

3.2.1.3 Behandlung der Antigenstämme

3.2.1.3.1 Abtötung

Der Inhalt eines jeden der 42 Gefäße wurde gleichmäßig auf drei Erlenmeyerkolben, die wieder Glasperlen enthielten, verteilt. In jedem der 126 (42 x 3) Kolben wurde die Flüssigkeitsmenge mit der entsprechenden Abschwemmflüssigkeit auf 20 ml aufgefüllt. Anschließend wurden die 126 Antigensuspensionen in drei Gruppen eingeteilt, wobei jede Gruppe alle sieben Serovare einmal enthielt. Die Abtötung erfolgte durch Wärme im Wasserbad.

- Gruppe 1: 1 h lang bei 56 °C
- Gruppe 2: Dreimal 30 min lang bei 60 °C mit Abkühlung zwischen den Erwärmungen
- Gruppe 3: 30 min lang bei 80 °C (ANZ et al., 1969) (wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen ausschließlich verwendet)

Nach dem Abkühlen wurden die Bakteriensuspensionen manuell und anschließend 60 min im Rüttler homogenisiert. Zur Kontrolle wurde von jedem Gemisch 1 ml Flüssigkeit aufgenommen, zentrifugiert (15 min bei 2000 g), der Bodensatz auf Tarschis-Blutagar ausgestrichen und drei bis vier Wochen bei 42 °C bebrütet. Einmal wöchentlich erfolgte eine Kontrolle auf Bakterienwachstum. Zum Vergleich dienten die kurz vor dem Abschwemmen mit vermehrungsfähigen Mykobakterien beimpften Nährbodenröhrchen. Die Mykobakterien galten als abgetötet, wenn im angegebenen Zeitraum kein Wachstum auftrat.
Nach Ansatz der Abtötungskontrolle wurden die 126 Antigensuspensionen zur Beseitigung grober Partikel durch achtfach gelegten sterilen Mull in sterile 100 ml Schraubgefäße gefiltert und bis zum Ergebnis des Kulturversuches im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.1.3.2 Einstellung des Bakterienzellgehalts nach EG-Richtlinien für "Salmonella pullorum" Antigene

Als Standardantigen wurde Tuberculognost (M. avium Serovar 2), Firma Biowet, Polen, verwendet. Entsprechend den EG-Richtlinien erfolgte die Einstellung der Zellkonzentration mit Trommsdorf-Röhrchen (Spezial-Zentrifugenröhrchen mit graduierter Kapillare und einem darüberliegendem Volumen von 10 ml).

Nach Suspendierung von 4 ml des aufgeschüttelten Tuberculognost in 196,0 ml 0,5 % phenolhaltiger, physiol. Kochsalzlösung und nach dem Mischen mit einem Magnetrührer wurden 10 Trommsdorf-Röhrchen mit je 10 ml gefüllt und anschließend 1 h bei 2000 g zentrifugiert. Die Zellmasse wurde mit einer Lupe abgelesen, und der Abstand zwischen den Teilstrichen als Zehntelbereiche geschätzt. Der Zellgehalt des Antigens in Vol% errechnet sich durch Dividieren des Mittelwertes mit dem Faktor 2, da die Ausgangsverdünnung 1 : 50 beträgt.
Nach Feststellung der Dichte des polnischen Präparates (1 Vol%) wurden die hergestellten Antigene demselben Verfahren unterzogen und entsprechend eingestellt. Es schloß sich eine nochmalige Überprüfung der Dichte nach Trommsdorf an.

3.2.2 Herstellung großer Antigenmengen

Für die Produktion großer Antigenmengen fanden Roux-Flaschen mit Zellstoffstopfen Verwendung, die mit 200 ml Middlebrook 7H10 Agar mit 20 ml Middlebrook OADC Enrichment beschickt und bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt wurden.
Unter sterilen Kautelen wurden dann die einzelnen Serovare in den bewachsenen Reagenzröhrchen mit physiol. Kochsalzlösung von ihrem Nährboden abgelöst und nach Homogenisierung durch achtfach gelegten Mull in leere Reagenzröhrchen gefiltert. Von jedem Serovar wurden ca. 3 ml aufgenommen und in Roux-Flaschen überführt. Durch leichtes Schwenken wurden die Suspensionen mit den vermehrungsfähigen Keimen auf dem Agar gleichmäßig verteilt. Anschließend erfolgte eine Bebrütung der Kulturen über drei bis vier Wochen.
Der dicht gewachsene Bakterienrasen wurde dann mit selbsthergestellten, abgeflammten Glasspateln und Phosphatpuffer (ANZ et al., 1969) abgeschwemmt. Nach Homogenisieren im Rüttler (1 h), Abtöten im Wasserbad (80 °C, 30 min) und erneutem Homogenisieren wurden die Antigene nach EG-Richtlinien auf 1 Vol% eingestellt.
Die so behandelten Antigensuspensionen wurden in kleine Portionen aufgeteilt, ein Teil lyophilisiert, ein Teil eingefroren, und der Rest im Kühlschrank aufbewahrt. Die eingefrorenen bzw. lyophilisierten Antigene wurden vor Gebrauch aufgetaut bzw. mit der entsprechenden Menge Aqua dest. rehydriert.

3.3 Herstellung von Antikörpern

3.3.1 Mit lebenden Mykobakterien

Pro Serovar wurden zwei Hühner mit je 1 x 10^8 lebenden Keimen/ml – eingestellt nach Mc Farland (BAILEY und SCOTT, 1966), suspendiert in pyhsiol. Kochsalzlösung – intravenös (Vena jugularis) infiziert.
Damit sich die Vögel nicht gegenseitig mit anderen M. avium Serovaren anstecken, wurde jedes Hühnerpaar isoliert untergebracht.
Nach sieben Tagen wurde Blut aus der Vena jugularis entnommen. Das gewonnene Citratblut (Citrat : Blut = 1 : 10) wurde 10 min bei 2000 g zentrifugiert und das Plasma im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.
Der Nachweis einer Antikörperbildung erfolgte anhand der OSA. Dazu wurden von den Antigensuspensionen und von den homologen Plasmen jeweils 50 µl auf einen Objektträger gebracht und vermischt. Die Reaktion wurde dann im Durchlicht (60 Watt) über schwarzem Hintergrund mindestens 3 min lang beobachtet. Zimmertemperatur beschleunigte die Reaktion. Waren Antikörper vorhanden, bildeten sich zwischen ihnen und den Antigenen Agglutinate aus, und der Flüssigkeitshintergrund klarte innerhalb von 3 min auf. Nach Feststellung von homologen Antikörpern wurden die Tiere entblutet und die Plasmen im Kühlschrank aufbewahrt.
Außer mit den homologen Antigenen wurden alle Plasmen auch noch mit Tuberculognost und den beschriebenen heterologen Antigenen untersucht.

3.3.2 Mit abgetöteten Mykobakterien

Pro Serovar wurden drei Hühner verwendet. Zur Injektion dienten die Antigensuspensionen der sieben Laborstämme, die nach Abschwemmen mit physiol. Kochsalzlösung, Abtöten im Wasserbad (30 min, 80 °C) auf eine optische Dichte von 0,6 im Philips-Photometer (546 nm, 1/2 Mikroküvetten) eingestellt waren (ANZ et al., 1969).
Je ca. 1,5 ml der Suspensionen wurde den Tieren im Abstand von drei bis vier Tagen intravenös (Vena cutanea ulnaris) appliziert. Nach sechs Injektionen wurde Citratblut gewonnen.
Wies die OSA mit den homologen Antigenen Antikörper im Plasma nach, wurden die Hühner unter Gewinnung von Citratblut getötet. Das nicht sofort benötigte Plasma wurde in ca. 6 ml Portionen aufgeteilt, tiefgefroren, bei Bedarf aufgetaut und zur Beseitigung der Kälteaggregate zentrifugiert (2000 g, 15 min).

3.4. Objektträgerschnellagglutination

Verwendet wurden 30 Vogelseren bzw. -plasmen, in denen anhand der OSA mit Tuberculognost (M. avium Serovar 2) Antikörper gegen M. avium nachweisbar waren.

Von den eigenen abgetöteten Antigenen wurden die sieben auf Middlebrook-Agar gewachsenen und nach ANZ et al. (1969) abgeschwemmten Serovare benutzt. Diese sieben Suspensionen bildeten mit den homologen Plasmen deutliche Agglutinate mit klarem Hintergrund.

Zur Abschätzung des Antigentiters wurden von den Antigenen neun Verdünnungsstufen (0,9% - 0,1%) mit dem Puffer nach ANZ et al. (1969) hergestellt. Mit diesen Verdünnungen pro Serovar wurden jeweils OSA von 10 Vogelseren bzw. -plasmen durchgeführt.

Desweiteren wurden in einem Bestand die neun Kontakttiere eines an Tuberkulose gestorbenen Huhnes mit Hilfe der OSA auf Antikörper gegen M. avium untersucht. Hierbei wurden neben Tuberculognost auch die oben beschriebenen sieben Antigene verwendet. Bei Feststellung von Antikörpern erfolgte nach Tötung der Tiere eine Sektion.

Ferner wurden 96 Vogelseren mit dem Standardantigen Tuberculognost auf Antikörper gegen M. avium Serovar 2 und mit M. intracellulare Serovar 8 auf entsprechende Antikörper gegen M. intracellulare Serovar 8 untersucht. Außer aviären Seren bzw. Plasmen wurden auch die Seren von drei Elenantilopen und einem Steinbock auf Antikörper gegen M. avium untersucht, die zusammen mit infiziertem Wassergeflügel untergebracht waren.

3.5 Langsamagglutination (Gruber-Widal)

Die Plasmen (siehe 3.3.2) gegen die sieben Referenzstämme wurden mit 0,5 ml physiol. Kochsalzlösung in einer $\log_2$-Reihe bis 2^{-12} verdünnt. Anschließend wurde zu jeder Verdünnungsstufe 0,5 ml der homologen Antigensuspension (optische Dichte 0,6) pipettiert. Außer mit dem homologen Antigen wurde jedes Plasma auch mit den heterologen Suspensionen zur Reaktion gebracht. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C wurden die Reaktionen im Schräglicht einer Lampe abgelesen.

Eine Negativkontrolle mit physiol. Kochsalzlösung wurde zusätzlich mitgeführt. Analog dem beschriebenen Makrosystem wurde das von GADEN (1976) entwickelten Mikrosystem benutzt. Hierbei wurden Cooke-Platten mit Rundböden verwendet, die vor dem Bebrüten mit Folie abgeklebt wurden.

Nach 24 h wurden die Reaktionen mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops (Diavert, Leitz) abgelesen.

3.6 Absorption zur Herstellung monovalenter Antikörper

In der Gruber-Widal-Reaktion und in der OSA traten Kreuzreaktionen mit heterologen Serovaren auf. Die störenden Komponenten wurden durch Absorption entfernt. Als Absorbens diente zunächst das Antigen von M. intracellulare Serovar 9, das relativ niedrig kreuzreagierte. Zur Absorption wurden Plasmakonzentrationen verwendet, die vier Stufen oberhalb der homologen Titer lagen. Es wurden vier Absättigungsreihen im Verhältnis 1 : 1, 1 : 2, 1 : 2,5, 1 : 3 (Plasma : Antigen Serovar 9, optische Dichte 0,6) angesetzt. Nach Vermischung von Plasma und entsprechender Antigenmenge wurde 24 h bei Zimmertemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (2000 g, 15 min). Mit dem jeweiligen Überstand wurde eine erneute Langsamagglutinationen durchgeführt, um den Erfolg der Absorption festzustellen.
Das mit M. intracellulare Serovar 9 (1 : 2,5) abgesättigte Plasma gegen M. avium Serovar 2 wurde anschließend noch mit Antigen M. avium Serovar 3 (optische Dichte 0,6) im Verhältnis 1 : 1 absorbiert, um die noch mit Serovar 3 bestehenden Kreuzreaktionen zu eliminieren. Analog wurden die Antikörper gegen M. intracellulare Serovar 8 zusätzlich mit Antigen M. intracellulare Serovar 6 abgesättigt, um diese Kreuzreaktionenen zu beseitigen. Eine erneute Langsamagglutination diente jeweils zur Kontrolle.

3.7 Serotypisierung

3.7.1 Herkunft der Feldstämme

Organproben (Leber und Milz) von 101 entweder Antikörper oder säurefeste Stäbchen tragender Vögel wurden von 1985-1987 im Institut gesammelt und bis zur Verarbeitung im Gefrierschrank bei -20 °C aufbewahrt (siehe Tabelle 4).
Für die Dekontamination von Begleitkeimen wurden zwei Methoden angewendet.
Die Proben der ersten 16 Tiere wurden dem Schwefelsäureverfahren (Fachnormenausschuß Medizin, 1976) unterzogen. Hierzu wurde jede Probe mit steriler physiol. Kochsalzlösung im Mörser zerrieben und 1 ml mit 6 ml 6 %

H_2SO_4 versetzt. Nach 10 min Einwirkzeit und 10 min Zentrifugation bei 2000 g wird der Überstand abgekippt und das Sediment auf drei Röhrchen mit 6 ml Middlebrook 7H10 Agar und Middlebrook OADC Enrichment (schräg gegossen) ausgestrichen. Da die Gesamteinwirkung der H_2SO_4 bis zum Verimpfen 20 min nicht überschreiten darf, wurde für die Dekontamination bei den restlichen 85 Proben das Verfahren nach BEERWERTH (1967) angewendet. Im Gegensatz zur Schwefelsäuremethode können mehrere Ansätze gleichzeitig bearbeitet werden. Nach dem Zermörsern des Untersuchungsmaterials mit steriler physiol. Kochsalzlösung wird 1 ml mit 10 ml 4%igem NaOH versetzt. Nach 15 min Einwirkzeit wird bei 2000 g 15 min zentrifugiert, und der Bodensatz mit 10 ml einer Mischung von 5%iger Oxalsäure und 0,1 % Malachitgrün leicht geschüttelt. Nach 15 min Einwirkzeit und nochmaliger Zentrifugation (15 min bei 2000 g) wird der Bodensatz auf drei Middlebrook-Agar-Röhrchen ausgestrichen, bei 42 °C bebrütet und wöchentlich einmal beurteilt.

Nach Ausbildung eines ausreichenden Bakterienrasens wurde mit Phosphatpuffer nach ANZ et al. (1969) abgeschwemmt, im Wasserbad (80 °C, 30 min) abgetötet und im Rüttler mit Glasperlen homogenisiert. Nach dem Filtern durch sterilen Mull wurden die Suspensionen der isolierten Keime im Philips-Photometer (546 nm, ANZ et al., 1969) auf eine optische Dichte von 0,6 eingestellt. Bis zur weiteren Verwendung verblieben die einzelnen Suspensionen im Kühlschrank.

Zur Kontrolle wurde ein Röhrchen von jedem Isolat an Dr. Schröder nach Borstel, Institut für experimentelle Biologie und Medizin, geschickt.

3.7.2 Serologische Differenzierung der Feldstämme

Die Differenzierung der Feldstämme erfolgte mittels der Langsamagglutination (ANZ et al., 1969). Hierbei wurden 0,5 ml der Antigene mit jeweils 0,5 ml der sieben monovalenten Plasmen vermischt und im Brutschrank (37 °C) für 24 h inkubiert. Als Kontrolle dienten Antigensuspensionen, die einerseits mit homologen Antikörpern, andererseits mit physiol. Kochsalzlösung versetzt waren. Nach 24 h wurden die Reaktionen abgelesen. Nach SCHAEFER (1965) und ANZ et al. (1969) ist für die eindeutige Zuordnung zu einem Serovar eine Langsamagglutination mit den Antikörpern eines anderen Referenzstammes notwendig. Diese Antikörper wurden wie beschrieben aus dem zweiten Satz der Referenzstämme von Herrn Dr. Schröder hergestellt und absorbiert.

Tabelle 4 Herkunft der Feldstämme

Nr	Tgb-Nr	Jahr	Spezies (WOLTERS, 1975-1982)		ZN-Fbg	Serol	Pathologisch-anatomischer Befund
1	869	1985	Küstenreiher	Egretta (E.) gularis	+	/	Ernährungszustand (EZ) kachektisch; Gran. in Milz und Leber; Nephropathie mit Gran.; subseröse Gran. in der Darmwand am Ende des Duodenums; weiße Stippchen im Bereich der gesamten Unterhaut; im Bereich der rechten Oberschenkelmuskulatur ca. taubeneigroßes Gran.
2	2451a	1986	Küstenreiher	E. gularis	/	+	EZ reduziert; multiple Granulome (Gran.)In der Leber und subserös in der Darmwand; einzelne Gran. auf der Niere und in der Haut des Fusses.
3	2451a	1986	Küstenreiher	E. gularis	/	+	EZ gut;reichlich intraabdominales Fett; keine sichtbaren Veränderungen.
4	2451a	1986	Küstenreiher	E. gularis	/	+	EZ reduziert; Leber und Milz mit multiplen Gran.; subseröse Gran. im aufsteigenden Ast des Duodenums, im Blinddarm- und Enddarmbereich, kurz vor Eintritt in die Kloake; subseröse Gran. am Magenausgang; reichlich intraabdominales Fett.
5	563	1986	Küstenreiher	E. gularis	+	/	EZ reduziert; Hepatopathie und -megalie mit Gran.; Milz geschwulstartig vergrößert; Nephrophatie.
6	2418	1985	Seidenreiher	E. garzetta	+	/	EZ reduziert; Gran. in der Milz, Leber, Kloake und im linken thorakalen Luftsack; Nephropathie.
7	2451a	1986	Seidenreiher	E. garzetta	/	+	EZ gut; multiple Gran. in der Leber; Milz besteht aus konfluierenden Gran.; subseröse Gran. im oberen Dünndarm, direkt am Magenausgang, sowie im mittleren Jejunum; Gran. in der Wand des Mastdarms vor Eintritt in die Kloake.
8	2451a	1986	Seidenreiher	E. garzetta	/	+	EZ gut; Leber und Milz mit feinen Gran.; subseröse Gran. im Dünndarmbereich am Magenausgang; Niere mit multiplen Gran.
9	2451a	1986	Seidenreiher	E. garzetta	/	+	EZ deutlich reduziert; Hepato- und Splenomegalie; subseröse Gran. am Magenausgang: Gran. in der Serosa.
10	712	1986	Seidenreiher	E. garzetta	+	/	EZ reduziert; Hepato- und Splenomegalie mit Gran.; Darmschleimhaut verdickt mit multiplen weißen Herden; zwei Gran. im Peritoneum; mittlere Zehe des rechten Ständers mit kirschkerngroßem Abszeß.
11	791	1987	Seidenreiher	E. garzetta	+	+	EZ leicht reduziert; Hepatopathie mit Gran.; Milz granulomatös; Nephropathie mit Gran.
12	792	1987	Seidenreiher	E. garzetta	/	+	EZ leicht reduziert; Leber und Milz mit feinen Gran; Nephropathie.
13	2393	1985	Hl. Ibis	Threskiornis (T.) aethiopicus	+	/	EZ kachektisch; Gran. in der Serosa des Magens, des Herzens, der Milz, in den Luftsäcken, im Darm und in den Lungen; Nephropathie.
14	2160	1985	Hl. Ibis	T. aethiopicus	+	/	EZ kachektisch; gesamte Leibeshöhle mit multiplen Gran. übersät.
15	2451a	1986	Hl. Ibis	Threskiornis (T.)	/	+	EZ reduziert; einzelne Gran. in der Leber; einzelne subseröse Gran. in der Darmwand.
16	2451a	1986	Hl. Ibis	T. aethiopicus	/	+	EZ gut; Gran. in der Milz; Niere mit deutlicher Läppchenzeichnung.
17	2451a	1986	Hl. Ibis	T. aethiopicus	/	+	EZ reduziert; subseröse Gran. im Enddarm, kurz vor Eintritt in die Kloake, im hinteren und mittleren Jejunum, am Magenausgang; Gran. im Luftsack und marginal angrenzendem Lungengewebe.
18	2451a	1986	Hl. Ibis	T. aethiopicus	/	+	EZ reduziert; Gran. in der Serosa; Gran. in der Leber und beidseitig marginal, costal in der Lunge.
19	2451a	1986	Hl. Ibis	T. aethiopicus	/	+	EZ gut; reichlich intraabdominales Fett; Hepatomegalie mit Gran.; einzelne Gran. in der Milz, auf der Niere, subserös in der Darmwand.
20	2478	1986	Hl. Ibis	T. aethiopicus	/	+	EZ reduziert; multiple weiße Gran. in Leber und Milz.
21	793	1987	Hl. Ibis	T. aethiopicus	/	+	EZ gut; Hepatopathie mit Gran.; Nephropathie; Lunge mit einzelnen Gran.
22	794	1987	Hl. Ibis	T. aethiopicus	/	+	EZ gut; Gran. in der Milz und Leber; Nephropathie.
23	795	1987	Hl. Ibis	T. aethiopicus	/	+	EZ gut; Hepatopathie und -megalie mit einzelnen Gran.; Nephropathie.
24	796	1987	Hl. Ibis	T. aethiopicus	/	+	EZ gut; Hepato- und Nephropathie

Fortsetzung Tabelle 4 Herkunft der Feldstämme

Nr	Tgb-Nr	Jahr	Spezies (WOLTERS, 1975-1982)		ZN-Fbg	Serol	Pathologisch-anatomischer Befund
25	797	1987	Hl. Ibis	T. aethiopicus	/	+	EZ gut; Nephropathie; Hepatopathie mit Gran.
26	2225	1985	Weißhalsibis	Theristicus (Th.) caudatus	+	/	EZ kachektisch; Hepatopathie mit Gran.; Pneumonie mit Gran.; Splenomegalie mit Gran.; Aerosacculitis mit Gran.; Gran. subserös im Duodenum und Knochenmark, sowie in der Haut an beiden Schnabelwinkeln.
27	2392	1985	Weißhalsibis	Th. caudatus	+	/	EZ kachektisch; Gran. im Bereich des Schnabelwinkels, in Haut, Leber, Milz, Lungen und Luftsäcken.
28	870	1985	Brillenibis	Th. melanopis	+	/	EZ kachektisch; Gran. in der Unterhaut im mittleren Bereich des Halses; granulomatöse Aerosacculitis; Gran. in der Milz und linken Lunge.
29	1278	1987	Kranich	Grus grus	+	/	EZ kachektisch; Gran. in Leber, Milz und subserös in der Darmwand; Verkäsung des linken Brust- und Klavikularluftsackes.
30	421	1987	Kranich	Grus grus	+	/	EZ reduziert; Leber und Milz mit multiplen, bis zu faustgroßen Gran., teilweise mit Pilzrasen
31	521	1985	Jungfernkranich	Anthropoides virgo	+	/	EZ kachektisch; granulomatöse Hepatitis, Pneumonie und Aero-sacculitis; Gran. subserös in der Darmwand, am Magen, in der Milz und in der Haut im Bereich beider Karpalgelenke.
32	702	1986	Andensichler	Plegadis sp.	+	/	EZ reduziert; bis zu haselnußgroße Gran. in der Leber, Milz, Drüsenmagenwand und Darmserosa.
33	565	1985	Kappensäger	Lophodytes cucullatus	+	/	EZ reduziert; Hepatitis mit Gran.; granulomatöse Pneumonie; Darmgekröse mit feinen Gran.; Fibrinausgüße in allen Luftsäcken.
34	140	1986	Sichelente	Eunetta falcata	+	/	EZ reduziert; Pneumonie mit Nekrosen in der Lunge; Hyperämie der Leber und Nieren; Blut im Darmlumen
35	34	1986	Versicolorente	Punanetta versicolor	+	/	EZ reduziert; Hepatopathie mit Gran.; Splenomegalie mit Gran.
36	867	1985	Blauflügelente	Spatula discors	+	/	EZ kachektisch; Hepatopathie mit Gran.; granulomatöse Pneumonie; Nephritis urica.
37	964	1985	Mandarinente	Dendronessa gericulata	+	/	EZ reduziert; Nephropathie mit Gran.; fibrinöse Polyserositis; granulomatöse Pneumonie.
38	2159	1985	Brautente	Aix sponsa	+	/	EZ gut; Aerosacculitis mit Gran.; Hyperämie der Leber.
39	182	1987	Kolbenente	Netta rufina	+	/	EZ reduziert; Gran. in der Leber, Lunge und subserös in der Darmwand, im Klavikularluftsack und Knochenmark.
40	527	1985	Kanadagans	Branta canadensis	+	/	EZ reduziert; granulomatöse Pneumonie und Aerosacculitis; Gran. subserös in der Darmwand, Milz und im Syrinxbereich; Pericarditis; Hyperämie der Leber.
41	137	1987	Bronzegans	Anserina sp.	+	/	EZ kachektisch; Leber, Milz und Lunge von multiplen Gran. durchsetzt.
42	2100	1985	Haushuhn	Gallus (G.) domesticus	+	/	EZ reduziert; Hepatopathie mit disseminierten gelben Gran.; multiple Gran. subserös in der Darmwand, Milz und rechten Lunge; Nephropathie.
43	1090a	1985	Haushuhn	G. domesticus	+	/	EZ reduziert; multiple Gran. in der Leber, Milz, subserös in der Darmwand und im Knochenmark.
44	1945	1985	Haushuhn	G. domesticus	+	/	EZ reduziert; Leber und Milz mit Gran.; Nephropathie; Pericarditis mit Hydropericard; Knochenmark granulomatös.
45	2421b	1985	Haushuhn	G. domesticus	+	/	EZ reduziert; Hepatopathie mit multiplen, speckigen Herden; Milz etwas geschwollen; Luftsäcke getrübt; Enteritis catarrhalis.
46	1825	1985	Haushuhn	G. domesticus	+	/	EZ reduziert; Spleno- und Hepatomegalie mit Gran.; subseröse Gran. in der Darmwand.
47	995	1985	Haushuhn	G. domesticus	+	/	EZ gut; Salpingitis; Peritonitis; Pneumonie; Nekroseherde in der Leber; erbsgroßes subseröses Gran. in der Darmwand.
48	1729	1985	Haushuhn	G. domesticus	+	/	EZ reduziert; Hepato- und Splenomegalie mit Gran. im Knochenmark.
49	1209	1985	Haushuhn	G. domesticus	+	/	EZ reduziert; Hepatomegalie mit Gran.; Gran. subserös in der Darmwand und Milz; Nephropathie.

Fortsetzung Tabelle 4 Herkunft der Feldstämme

Nr	Tgb-Nr	Jahr	Spezies (WOLTERS, 1975-1982)		ZN-Fbg	Serol	Pathologisch-anatomischer Befund
50	2031	1985	Haushuhn	G. domesticus	+	/	EZ reduziert; Hepato- und Splenomegalie mit Gran.; subseröse Gran. in der Darm- und Muskelmagenwand.
51	1252	1985	Haushuhn	G. domesticus	+	/	EZ reduziert; Hepatomegalie mit Gran.; fibrinöse Polyserositis; Gran. in der Milz, subserös in der Darmwand, Lunge und auf den serösen Häuten.
52	518	1985	Haushuhn	G. domesticus	-	+	EZ adipös; Fettleber; innere Organe o. B.
53	555	1986	Haushuhn	G. domesticus	+	/	EZ deutlich reduziert; Hepatomegalie mit Gran.; Nephropathie; Gran. subserös in der Darmwand des Duodenums.
54	51	1986	Haushuhn	G. domesticus	+	/	EZ reduziert; Hepatopathie mit disseminierten Gran.; Splenomegalie mit Gran.; Gran. subserös in der Darmwand; Nephropathie.
55	433a	1986	Haushuhn	G. domesticus	+	/	EZ reduziert; Nephropathie; Gran. in der Milz und subserös in der Darmwand; granulomatöse Hepatitis.
56	535	1986	Haushuhn	G. domesticus	+	/	EZ reduziert; Hepatomegalie mit multiplen Gran.; Duodenum mit Gran. in der Darmwand; Nephropathie.
57	528	1986	Haushuhn	G. domesticus	+	/	EZ stark reduziert; Hepatomegalie mit disseminierten Gran.; kirschkerngroßes Gran. subserös in der mittleren Duodenalwand; Nephropathie.
58	895	1986	Haushuhn	G. domesticus	+	/	EZ adipös; Gran. in der Leber, Milz und subserös in der Darmwand.
59	724	1986	Haushuhn	G. domesticus	+	/	EZ kachektisch; multiple, disseminierte weiß-gelbliche Gran. in der Leber und Niere
60	574	1986	Haushuhn	G. domesticus	+	/	EZ reduziert; Hepatopathie und -megalie mit miliaren Gran.; Splenomegalie mit disseminierten Gran.; Nephropathie.
61	882	1986	Haushuhn	G. domesticus	+	/	EZ kachektisch; Dilatation des rechten Herzens; weiße harte Beläge auf dem Herzbeutel; Leber mit Gran. durchsetzt.
62	326	1987	Haushuhn	G. domesticus	+	/	EZ reduziert; Hepatopathie und -megalie mit Gran.; Gran. in der Milz, Thymusleiste, Subserosa der Darmwand, auf der Herzspitze und im Knochenmark.
63	345	1987	Haushuhn	G. domesticus	+	/	EZ kachektisch; Hepatopathie und -megalie mit Gran.; Gran. in der Milz, und subserös in der Darmwand
64	1078	1987	Haushuhn	G. domesticus	+	+	EZ reduziert;multiple Gran. in Leber, Milz und subserös in der Darmwand
65	-	1987	Haushuhn	G. domesticus	/	+	EZ reduziert; Gran. in Milz und Leber.
66	-	1987	Haushuhn	G. domesticus	/	+	EZ reduziert; Hepatopathie; Gran. in Leber und Milz.
67	-	1987	Haushuhn	G. domesticus	/	+	EZ reduziert; granulomatöse Milz.
68	-	1987	Haushuhn	G. domesticus	/	+	EZ kachektisch; Leber und Milz mit multiplen Gran.
69	-	1987	Haushuhn	G. domesticus	/	+	EZ kachektisch; Gran. in Leber und Milz.
70	-	1987	Haushuhn	G. domesticus	/	+	EZ gut; Milz mit stecknadelkopfgroßen Gran.
71	-	1987	Haushuhn	G. domesticus	/	+	EZ gut; multiple feine Gran. in der Leber.
72	-	1987	Haushuhn	G. domesticus	/	+	EZ reduziert; erbsgroße Gran. in Leber und Milz.
73	-	1987	Haushuhn	G. domesticus	/	+	EZ reduziert; Hepatopathie; erbsgroße Gran. in Leber und Milz.
74	-	1987	Haushuhn	G. domesticus	/	+	EZ gut; Milz mit stecknadelkopfgroßen Gran.
75	-	1987	Haushuhn	G. domesticus	/	+	EZ reduziert; Milz und Leber mit bis zu erbsgroßen Gran.
76	559	1985	Bankiva-Huhn	Gallus gallus	-	/	EZ deutlich reduziert; Hyperämie der Leber und Nieren; verschiedene, bis zu haselnußgroße subseröse Gran. in der Darmwand.
77	135	1987	Helmperlhuhn	Numida (N.) meleagris	+	/	EZ gut; Hepatopathie und -megalie mit Gran.; granulomatöse Milz.
78	309	1987	Helmperlhuhn	N. meleagris	-	+	EZ adipös; hochgradige Leberverfettung mit Gran.; subseröse Gran. in der Duodenalwand.
79	310	1987	Helmperlhuhn	N. meleagris	-	+	EZ adipös; hochgradige Verfettung des Lebergewebes; Knochenmark sehr hell und fettig.

Fortsetzung Tabelle 4 Herkunft der Feldstämme

Nr	Tgb-Nr	Jahr	Spezies (WOLTERS, 1975-1982)		ZN-Fbg	Serol	Pathologisch-anatomischer Befund
80	-****	1987	Helmperlhuhn	N. meleagris	+	/	EZ gut; Gran. in Leber, Milz und Drüsenmagen.
81	2350	1986	Elliot-Fasan	Calophasis ellioti	+	/	EZ kachektisch; Hepatopathie mit Gran.; granulomatöse Milz; multiple subseröse Gran. in der Darmwand; Enteritis catarrhalis.
82	1285	1985	Goldfasan	Chrysolophus pictus	+	/	EZ reduziert; Leber, Milz, seröse Häute und Lunge mit Gran.; Nephropathie.
83	1881	1985	Pfau	Pavo (P.) cristatus	+	/	EZ reduziert; Gran. in der Leber; ca. tennisballgroße Veränderung in der rechten Lunge; Nephropathie.
84	1539	1987	Pfau	P. cristatus	+	+	EZ gut; Leberoberfläche rauh, nadelstichfeine nekrotische Herdchen im Lebergewebe; Darmgefäße deutlich injiziert.
85	169	1986	Textorweber	Textor sp.	+	/	EZ wenig reduziert; Enteritis mit hochgradiger Verdickung der Darmwand mit kleinen Knötchen; Nephropathie.
86	1813	1985	Textorweber	Textor sp.	+	/	EZ reduziert; Eileiterbauchfellentzündung; Hepatomegalie.
87	-	-	Lachtaube	Streptopelia roseogrisea	+	/	Keine Sektion durchgeführt.
88	1199	1985	verwilderte Stadttaube	Columba livia forma urbana	+	/	EZ reduziert; Hepatomegalie mit Gran.; stecknadelkopfgroßes Knötchen im linken thorakalen Luftsack und in der Milz.
89	2022	1986	Rassetaube	Columba livia varatio domestica	+	/	EZ reduziert; subseröse Gran. entlang des Darmkonvoluts; Hepatopathie mit Gran.; Nephropathie; Fibrinausguß im linken thorakalen Luftsack.
90	2261	1985	Fruchttaube	Ducula sp.	-	/	EZ reduziert; Hepatomegalie mit Marmorierung; Splenomegalie; subseröse Gran. im Duodenalbereich; Nephropathie.
91	2297	1986	Rote Erdtaube	Trugon terrestris rubrum	+	/	EZ reduziert; Hepatomegalie mit Gran.; multiple Gran. subserös in der Darmwand; Splenomegalie mit Gran.; Nierenschwellung; Gran. im Knochenmark.
92	-	-	Krähe	Corvus sp.	+	-	Keine Sektion durchgeführt.
93	703	1985	Saatkrähe	Corvus frugilegus	+	/	EZ kachektisch; Dilatation der Herzkammer; Lunge Anthrakose; Leber mit Gran. durchsetzt.
94	2030	1986	Sakerfalke	Hierofalco cherrug	+	/	EZ kachektisch; Hepatopathie mit Gran.; weitere Gran. in der Milz und im thorakalen Luftsack.
95	2292	1985	Turmfalke	Falco tinnunculus	+	/	EZ reduziert; Gran. in der Leber und im unteren Abschnitt der linken Lunge; Nephropathie mit Uratablagerungen.
96	1367/2	1985	Lannerfalke	Hierofalco (H.) biarmicus	+	/	EZ reduziert; Hepatopathie mit Gran.; granulomatöse Pneumonie; Nephropathie mit Uratablagerungen; Gran im Knochenmark.
97	1367/3	1985	Lannerfalke	H. biarmicus	+	/	EZ kachektisch; Hepatopathie mit Gran.; granulomatöse Milz und Aerosacculitis; subseröse Gran. in der Darmwand; Nephropathie.
98	1367/4	1985	Lannerfalke	H. biarmicus	+	/	EZ kachektisch; Gran. in der Leber, Milz, subserös in der Darmwand, Lunge und Pleura; Polyserositis fibrinosa.
99	1367/5	1985	Lannerfalke	H. biarmicus	+	/	EZ reduziert; Gran. subserös in der Darmwand, Leber, in den Lungen und Luftsäcken.
100	1367/6	1985	Lannerfalke	H. biarmicus	+	/	EZ reduziert; granulomatöse Aerosacculitis; Gran. in den Lungen; Nephropathie mit Uratablagerungen.
101	1367/7	1985	Lannerfalke	H. biarmicus	+	/	EZ reduziert; granulomatöse Veränderungen im Bereich des Schultergelenks, in der Leber, Milz, in den Luftsäcken, in der rechten Lunge und subserös in der Darmwand; Nephropathie.

Tgb-Nr: Tagebuchnummer der Sektion
ZN-Fbg: Ziehl-Neelsen-Färbung
Serol: Serologie
/: nicht durchgeführt

**** Die Organe wurden freundlicherweise vom Veterinäramt Saarbrücken zur Verfügung gestellt

4 Ergebnisse

4.1 Antigensuspensionen

4.1.1 Kultur der Antigenstämme

Auf allen Nährmedien war schon nach einer Woche ein Wachstum der Laborstämme erkennbar. Auf dem Tarschis-Blutagar wuchsen die Mykobakterien nur auf der Oberfläche streuselartig und mit trockener, krümeliger Konsistenz. Ein feuchtes, schleimiges Aussehen wiesen dagegen die Keime auf Löwenstein-Jensen Eiernährboden und Middlebrook-Agar auf. Auch auf dem Middlebrook-Agar wuchsen die Bakterien nur auf dessen Oberfläche. Dagegen zeigte sich auf dem Eiernährboden auch ein Wachstum der Keime in die Tiefe des Nährbodens.
Beim Ablösen der Mykobakterien mit einer Platinöse war der gummiartige Eiernährboden besser zu handhaben als die beiden anderen, die sich aufgrund ihrer geleeartigen Konsistenz leichter beschädigen ließen. Bezüglich der Suspendierbarkeit der Keime beim Abschwemmen verhielten sich beiden Puffer gleich gut.

4.1.2 Behandlung der Antigensuspensionen

Eine Abtötung der Mykobakterien wurde mit allen drei Methoden erreicht.
Außer bei den Antigenen vom Tarschis-Blutagar konnte eine Zelldichte von 1 Vol% (wie die des Tuberculognost) eingestellt werden. Bei den Suspensionen vom Tarschis-Blutagar waren kurz nach dem Abschwemmen wie bei GÖTZ (1984) erhebliche Aggregate aufgetreten. Weder Schütteln noch Homogenisieren mit Glaskugeln im Rüttler führten zur Resuspendierung des Bodensatzes und zu einer homogenen Suspension. Die unbrauchbaren Antigene wurden unschädlich beseitigt.
Nach Einstellung auf 1 Vol% wiesen die Suspensionen von den übrigen Nährböden eine unterschiedliche Stabilität auf. Die vom Löwenstein-Jensen Eiernährboden zeigten nach 24 h mehr Bodensatz mit stärkerem Aufklaren des Flüssigkeitsüberstandes als die vom Middlebrook-Agar.
Außerdem übten auch die Abschwemmflüssigkeiten einen Einfluß auf die Stabilität der Suspensionen aus. Die Antigene der beiden Nährböden, die mit dem Puffer nach ANZ et al. (1969) hergestellt worden sind, zeigten sich stabiler als die mit der physiol. Kochsalzlösung nach GÖTZ (1984). Durch

leichtes Schwenken ließen sich aber die Antigensuspensionen resuspendieren und blieben mehrere Stunden stabil.
Bei der Überprüfung der Antigene mit physiol. Kochsalzlösung auf Objektträgern waren keine Autoagglutinationen festzustellen.
Dagegen waren die aufgetauten bzw. lyophilisierten rehydrierten Suspensionen durch Autoagglutinationen unbrauchbar. Eine Behandlung mit Ultraschall bewirkte nur eine vorübergehende Homogenität.

4.2 Reaktion der Antigensuspensionen mit homologen und heterologen Antikörpern (siehe Tabelle 5)

Mittels der OSA wurden die Antigensuspensionen vom Löwenstein-Jensen Medium mit denen vom Middlebrook-Agar verglichen. Zusätzlich wurde geprüft, inwieweit die verwendeten Pufferlösungen einen Einfluß auf die Agglutination haben.
Mit allen Antigenen ließen sich sowohl homologe, als auch heterologe Reaktionen innerhalb von 3 min nachweisen. Am schnellsten reagierten die Suspensionen, die vom Middlebrook-Agar mit Phosphatpuffer gewonnen wurden.
Die Größe der Aggregate reichte von klein bis sehr groß, wobei eine mittlere Größe am häufigsten auftrat.
Ein deutliches Aufklaren des Flüssigkeitshintergrundes wiesen die Suspensionen mit dem Puffer nach ANZ et al. (1969) auf. Dies stand im Gegensatz zur Kochsalzlösung nach GÖTZ (1984), die bereits ohne Antigene eine gewisse Trübung zeigt. Es wurde deshalb im weiteren Verlauf nur noch mit dem Puffer nach ANZ et al. (1969) und Kultur der Antigenstämme auf Middlebrook 7H10 Agar mit Middlebrook OADC Enrichment gearbeitet.
Wie aus der Tabelle 5 hervorgeht, verliefen die Reaktionen zwischen homologen Antigenen und Antikörpern schneller ab als zwischen den heterologen. Die Größe der gebildeten Aggregate ist bei homologen und heterologen Reaktionen ungleichmäßig verteilt.

Tabelle 5 Reaktionen der Antigensuspensionen mit homologen und heterologen Antikörpern

Antigensuspensionen (Löwenstein-Jensen Eiernährboden, Kochsalzlösung nach GÖTZ (1984), 80 °C, 30 min)

Antikörper:	Antigen Serovar:	1	2	3	4	6	8	9
Serovar 1	sec	15	24	24	22	20	18	35
	F	m	k	k	k	k	k	k
Serovar 2	sec	14	13	14	32	13	13	18
	F	k	k	k	k	k	k	k
Serovar 3	sec	21	16	13	78	21	27	15
	F	k	k	k	k	k	k	k
Serovar 4	sec	23	25	31	12	23	55	60
	F	k	k	k	k	k	k	k
Serovar 6	sec	33	42	62	59	19	28	88
	F	k	k	k	k	k	k	k
Serovar 8	sec	28	20	27	43	12	11	37
	F	k	k	k	k	k	k	k
Serovar 9	sec	44	14	14	80	33	40	9
	F	k	k	k	k	k	k	k

Hintergrund leicht trüb

Antigensuspensionen (Löwenstein-Jensen Eiernährboden, Phophatpuffer nach ANZ et al.(1969), 80 °C, 30 min)

Antikörper:	Antigen Serovar:	1	2	3	4	6	8	9
Serovar 1	sec	15	19	19	17	17	17	17
	F	g	g	g	g	g	g	m
Serovar 2	sec	19	13	12	18	12	13	18
	F	m	k	g	m	g	g	m
Serovar.3	sec	18	18	13	20	16	13	15
	F	m	m	g	m	m	g	k
Serovar 4	sec	15	14	15	8	15	14	17
	F	g	g	g	sg	g	g	m
Serovar 6	sec	21	11	13	16	9	10	20
	F	k	m	k	k	g	m	k
Serovar 8	sec	13	13	10	19	10	09	13
	F	g	m	g	g	g	sg	m
Serovar 9	sec	14	9	9	12	13	8	8
	F	m	g	g	g	m	sg	g

Hintergrund klar

sec: Zeit in Sekunden, ab der deutliche Agglutinate erkennbar sind
F: Flocken
sg: sehr groß, g: groß, m: mittel, k: klein

Fortsetzung Tabelle 5 Reaktionen der Antigensuspensionen mit homologen und heterologen Antikörpern

Antigensuspensionen (Middlebrook 7H10 Agar mit Middlebrook OADC Enrichment, Kochsalzlösung nach GÖTZ (1984), 80°C,30 min)

Antikörper: \ Antigen Serovar:		1	2	3	4	6	8	9
Serovar 1	sec	13	14	14	15	15	13	15
	F	m	m	k	k	m	m	m
Serovar 2	sec	13	13	14	15	14	14	14
	F	m	m	m	m	k	m	m
Serovar 3	sec	17	10	11	15	14	12	12
	F	m	k	m	k	k	m	m
Serovar 4	sec	16	19	13	10	14	11	17
	F	m	m	m	k	m	k	k
Serovar 6	sec	23	19	18	14	13	15	15
	F	k	k	k	m	m	k	k
Serovar 8	sec	20	18	17	14	12	10	18
	F	k	m	m	k	m	g	m
Serovar 9	sec	23	13	13	40	24	14	10
	F	m	m	k	k	m	m	m

Hintergrund leicht trüb

Antigensuspensionen (Middlebrook 7H10 Agar mit Middlebrook OADC Enrichment, Phosphatpuffer nach ANZ et al.(1969), 80 °C, 30 min)

Antikörper: \ Antigen Serovar:		1	2	3	4	6	8	9
Serovar 1	sec	11	13	13	14	15	11	15
	F	m	m	m	m	m	g	k
Serovar 2	sec	12	9	12	15	11	11	14
	F	m	m	m	k	m	m	k
Serovar 3	sec	18	9	9	17	14	10	10
	F	m	m	m	k	k	k	k
Serovar 4	sec	16	19	12	7	14	8	19
	F	m	k	m	m	k	m	k
Serovar 6	sec	25	18	18	19	10	10	12
	F	k	k	k	k	m	m	k
Serovar 8	sec	20	17	15	16	10	6	18
	F	m	k	m	k	m	sg	k
Serovar 9	sec	25	10	13	45	22	11	7
	F	m	m	m	k	k	m	m

Hintergrund klar

sec: Zeit in Sekunden, ab der deutliche Agglutinate erkennbar sind
F: Flocken
sg: sehr groß, g: groß, m: mittel, k: klein

Fortsetzung Tabelle 5 Reaktionen der Antigensuspensionen mit homologen und heterologen Antikörpern

Antikörper / Serovar: / Tuberculognost		1	2	3	4	6	8	9
Serovar 2	sec	20	18	25	17	37	19	16
	F	g	m	g	m	m	g	g

Hintergrund klar

sec: Zeit in Sekunden, ab der deutliche Agglutinate zu erkennen sind
F: Flocken (g: groß, m: mittel)

4.3 Objektträgerschnellagglutination mit Patientenseren

Bei der OSA von 30 Vogelseren bzw. -plasmen mit den sieben Serovaren zeigte sich, daß alle Seren bzw. Plasmen nicht nur mit einem Serovar, sondern mit mehreren, deutliche Agglutinate mit Aufklaren des Hintergrundes bildeten (siehe Tabelle 6).

Bei der Abschätzung von Antigentitern mit Vogelseren zeigten die Antigene bis zu einer Zelldichte von 0,5 Vol% noch deutliche Reaktionen. Bei einigen Patientenseren traten sogar bei einer Antigenkonzentration von 0,1 Vol% noch Flockenbildungen auf (siehe Tabelle 7).

Die vergleichende serologische Untersuchung der neun Kontakttiere eines an Tuberkulose gestorbenen Huhnes mit Tuberculognost und den eigenen Antigensuspensionenen zeigte, daß alle Hühner Antikörper gegen M. avium und M. intracellulare aufwiesen, aber nicht nur gegen ein Serovar, sondern gegen mehrere. Die meisten Reaktionen traten gegen Serovar 3 und 6 auf. Der pathologisch-anatomische Befund ergab bei sieben Tieren Tuberkulome (siehe Tabelle 8).

Bei der Untersuchung von 96 Vogelplasmen wurden mit dem Standardantigen zwei, mit M. intracellulare Serovar 8 54 Reagenten festgestellt. Der Hl. Ibis (Nr. 25) reagierte mit beiden Antigenen. Beim Königsfasan (Nr. 93) trat mit dem eigenen Antigen Geleebildung auf, während sich mit Tuberculognost Antikörper nachweisen ließen (siehe Tabelle 9).

Die OSA mit Säugetierseren zeigte, daß drei Elenantilopen Antikörperträger gegen Serovar 3, 4, 8, 9 waren, und der Steinbock Antikörper gegen Serovar 1, 3, 8, 9 aufwies. Die intrakutane Tuberkulinisierung der vier Säugetiere mit bovinen und aviären Sensitinen hatte keine Reaktion zur Folge.

Tabelle 6 OSA der sieben Serovare mit 30 Seren bzw. Plasmen, bei denen Antikörper mit Tuberculognost (M. avium Serovar 2) nachweisbar waren

Nr	Spezies (WOLTERS, 1975-1982)		Antigensuspension: Serovar 1	2	3	4	6	8	9	N
1	Küstenreiher	Egretta (E.) gularis	–	+	+	–	+	+	+	–
2	Küstenreiher	E. gularis	–	+	+	–	–	–	–	–
3	Küstenreiher	E. gularis	–	–	–	–	–	+	–	–
4	Seidenreiher	E. garzetta	–	+	+	–	–	+	+	–
5	Seidenreiher	E. garzetta	–	+	–	–	–	–	–	–
6	Seidenreiher	E. garzetta	–	+	+	–	+	+	+	–
7	Seidenreiher	E. garzetta	–	+	+	–	+	+	+	–
8	Seidenreiher	E. garzetta	–	+	+	–	–	+	+	–
9	Hl. Ibis	Threskiornis (T.) aethiopicus	–	–	+	–	–	+	+	–
10	Hl. Ibis	T. aethiopicus	–	+	+	–	+	+	+	–
11	Hl. Ibis	T. aethiopicus	+	+	+	–	–	+	–	–
12	Pfau	Pavo cristatus	+	+	+t	+	+t	+	+	–
13	Pfau	Pavo cristatus	+	+	+	+	+	+	+	–
14	Bartkauz	Strix nebulosa	+	+	+	+	+	+	+	–
15	Moschusente	Cairina moschata	–	–	–	–	–	+	+	–
16	Haushuhn	Gallus (G.) domesticus	–	–	–	–	+	+	–	–
17	Haushuhn	G. domesticus	–	–	–	+	–	+	+t	–
18	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	–
19	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	–	+	+	+t	–
20	Haushuhn	G. domesticus	+	–	+t	–	–	+	–	–
21	Haushuhn	G. domesticus	–	–	–	–	+	+	+	–
22	Haushuhn	G. domesticus	–	–	–	–	+	+	–	–
23	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	–
24	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+t	–
25	Haushuhn	G. domesticus	–	–	–	+	+	+	+	–
26	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	–	+	+	+t	–
27	Haushuhn	G. domesticus	–	+	+	+t	+	+	+	–
28	Haushuhn	G. domesticus	–	–	+	–	+	+	–	–
29	Haushuhn	G. domesticus	–	–	–	–	+t	+	–	–
30	Haushuhn	G. domesticus	+t	+t	–	–	+t	+	+t	–
31	Kontrolle NaCl		–	–	–	–	–	–	–	–

N: NaCl zur Kontrolle
+: Agglutinationen, –: keine Agglutinationen, t: trüb

Tabelle 7 OSA zur Abschätzung des Antigentiters

Nr	Spezies (WOLTERS, 1975-1982)		Antigensuspension 0,9 Vol%: Serovar 1	2	3	4	6	8	9	N
1	Bartkauz	Strix nebulosa	+	+	+	+	+	+	+	-
2	Küstenreiher	E. gularis	/	+	+	/	+	+	+	-
3	Pfau	Pavo cristatus	+	+	+	+	+	+	+	-
4	Pfau	Pavo cristatus	+	+	+	+	+	+	+	-
5	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	-
6	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	/	+	+	+	-
7	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	-
8	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	-
9	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	/	+	+	+	-
10	Haushuhn	G. domesticus	/	+	+	+	+	+	+	-

Nr	Spezies (WOLTERS, 1975-1982)		Antigensuspension 0,8 Vol%: Serovar 1	2	3	4	6	8	9	N
1	Bartkauz	Strix nebulosa	+	+	+	+	+	+	+	-
2	Küstenreiher	E. gularis	/	+	+	/	+	+	+	-
3	Pfau	Pavo cristatus	+	+	+	+	+	+	+	-
4	Pfau	Pavo cristatus	+	+	+	+	+	+	+	-
5	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	-
6	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	/	+	+	+	-
7	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	-
8	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	-
9	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	/	+	+	+	-
10	Haushuhn	G. domesticus	/	+	+	+	+	+	+	-

Nr	Spezies (WOLTERS, 1975-1982)		Antigensuspension 0,7 Vol%: Serovar 1	2	3	4	6	8	9	N
1	Bartkauz	Strix nebulosa	+	+	+	+	+	+	+	-
2	Küstenreiher	E. gularis	/	+	+	/	+	+	+	-
3	Pfau	Pavo cristatus	+	+	+	+	+	+	+	-
4	Pfau	Pavo cristatus	+	+	+	+	+	+	+	-
5	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	-
6	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	-
7	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	-
8	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	-
9	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	/	+	+	+	-
10	Haushuhn	G. domesticus	/	+	+	+	+	+	+	-

N: NaCl zur Kontrolle
/: keine Antikörper nachweisbar mit 1 Vol%
Agglutinationen: + (deutlich), +- (gerade noch), - (keine)

Fortsetzung Tabelle 7 OSA zur Abschätzung des Antigentiters

Nr	Spezies (WOLTERS, 1975-1982)		Antigensuspension 0,6 Vol%: Serovar 1	2	3	4	6	8	9	N
1	Bartkauz	Strix nebulosa	+	+	+	+	+	+	+	-
2	Küstenreiher	E. gularis	/	+	+	/	+	+	+	-
3	Pfau	Pavo cristatus	+	+	+	+	+	+	+	-
4	Pfau	Pavo cristatus	+	+	+	+	+	+	+	-
5	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	-
6	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	/	+	+	+	-
7	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	-
8	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	-
9	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	/	+	+	+	-
10	Haushuhn	G. domesticus	/	+	+	+	+	+	+	-

Nr	Spezies (WOLTERS, 1975-1982)		Antigensuspension 0,5 Vol%: Serovar 1	2	3	4	6	8	9	N
1	Bartkauz	Strix nebulosa	+	+	+	+	+	+	+	-
2	Küstenreiher	E. gularis	/	+	+	/	+	+	+	-
3	Pfau	Pavo cristatus	+	+	+	+	+	+	+	-
4	Pfau	Pavo cristatus	+	+	+	+	+	+	+	-
5	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	-
6	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	/	+	+	+	-
7	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	-
8	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	-
9	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	/	+	+	+	-
10	Haushuhn	G. domesticus	/	+	+	+	+	+	+	-

Nr	Spezies (WOLTERS, 1975-1982)		Antigensuspension 0,4 Vol%: Serovar 1	2	3	4	6	8	9	N
1	Bartkauz	Strix nebulosa	+	+	+	+	+	+	+	-
2	Küstenreiher	E. gularis	/	+-	+	/	+	+	+	-
3	Pfau	Pavo cristatus	+-	+	+	+	+	+	+	-
4	Pfau	Pavo cristatus	+	+	+	+	+	+	+	-
5	Haushuhn	G. domesticus	+-	+	+	+	+	+	+	-
6	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	/	+	+	+	-
7	Haushuhn	G. domesticus	+-	+	+	+	+	+	+	-
8	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	-
9	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	/	+	+	+	-
10	Haushuhn	G. domesticus	/	+-	+	+	+	+	+	-

N: NaCl zur Kontrolle
/: keine Antikörper nachweisbar mit 1 Vol%
Agglutinationen: + (deutlich), +- (gerade noch), - (keine)

Fortsetzung Tabelle 7 OSA zur Abschätzung des Antigentiters

Nr	Spezies (WOLTERS, 1975-1982)		Antigensuspension 0,3 Vol%: Serovar 1	2	3	4	6	8	9	N
1	Bartkauz	Strix nebulosa	+	+	+	+	+	+	+	-
2	Küstenreiher	E. gularis	/	+-	+	/	+	+	+	-
3	Pfau	Pavo cristatus	-	+	+	+	+	+	+	-
4	Pfau	Pavo cristatus	+	+	+	+	+	+	+	-
5	Haushuhn	G. domesticus	+-	+	+-	+	+	+	+	-
6	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	/	+	+	+	-
7	Haushuhn	G. domesticus	+-	+	+	+	+	+	+	-
8	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	-
9	Haushuhn	G. domesticus	+-	+	+	/	+	+	+	-
10	Haushuhn	G. domesticus	/	+-	+	+	+	+	+	-

Nr	Spezies (WOLTERS, 1975-1982)		Antigensuspension 0,2 Vol%: Serovar 1	2	3	4	6	8	9	N
1	Bartkauz	Strix nebulosa	+	+	+	+	+	+	+	-
2	Küstenreiher	E. gularis	/	-	+	/	+	+	+	-
3	Pfau	Pavo cristatus	-	+	+	+	+	+	+	-
4	Pfau	Pavo cristatus	-	+-	+-	+	+	+	+	-
5	Haushuhn	G. domesticus	-	+	-	+	+	+	+	-
6	Haushuhn	G. domesticus	+	+-	+	/	+	+	+	-
7	Haushuhn	G. domesticus	-	+	+	+	+	+	+	-
8	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	-
9	Haushuhn	G. domesticus	-	+	+	/	+	+	+	-
10	Haushuhn	G. domesticus	/	-	+	+	+	+	+	-

Nr	Spezies (WOLTERS, 1975-1982)		Antigensuspension 0,1 Vol%: Serovar 1	2	3	4	6	8	9	N
1	Bartkauz	Strix nebulosa	+	+	+	+	+	+	+	-
2	Küstenreiher	E. gularis	/	-	+	/	+	+	+	-
3	Pfau	Pavo cristatus	-	+	+	+	+	+	+	-
4	Pfau	Pavo cristatus	-	+-	+-	+	+	+	+	-
5	Haushuhn	G. domesticus	-	+	-	+	+	+	+	-
6	Haushuhn	G. domesticus	+	+-	+	/	+	+	+	-
7	Haushuhn	G. domesticus	-	+	+	+	+	+	+	-
8	Haushuhn	G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	-
9	Haushuhn	G. domesticus	-	+	+	/	+	+	+	-
10	Haushuhn	G. domesticus	/	-	+	+	+	+	+	-

N: NaCl zur Kontrolle
/: keine Antikörper nachweisbar mit 1 Vol%
Agglutinationen: + (deutlich), +- (gerade noch), - (keine)

Tabelle 8 OSA zwischen Tuberculognost bzw. Antigenen der sieben Serovare und den Plasmen der Kontakttiere eines an Tuberkulose gestorbenen Huhnes mit pathologisch-anatomischem Befund (Tagebuch-Nr. 2399, 1987)

Nr	Spezies (WOLTERS, 1975-82)	T	1	2	3	4	6	8	9	N
1	Haushuhn G. domesticus	–	–	–	+	–	+t	+	–	–
2	Haushuhn G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	+	–
3	Haushuhn G. domesticus	–	–	–	+	–	+t	+	–	–
4	Haushuhn G. domesticus	+	–	+	+	+t	+	–	+	–
5	Haushuhn G. domesticus	+t	+	+t	+	+t	+	+	+	–
6	Haushuhn G. domesticus	+	+	+	+	+	+	+	+	–
7	Haushuhn G. domesticus	–	–	–	+	–	+	–	–	–
8	Haushuhn G. domesticus	+	–	–	+	–	+	+v	+	–
9	Haushuhn G. domesticus	+v	–	–	+	–	+	–	+	–
10	Kontrolle NaCl	–	–	–	–	–	–	–	–	

T: Tuberculognost, N: NaCl zur Kontrolle
+: Agglutinationen, –: keine Agglutinationen
v: verzögerte Reaktion, t: Hintergrundflüssigkeit trüb

Nr	Spezies (WOLTERS, 1975-82)	Pathologisch-anatomischer Befund
1	Haushuhn G. domesticus	Ernährungszustand (EZ) reduziert; multiple disseminierte, bis zu stecknadelkopfgroße weiße Herdchen im Lebergewebe, übrige Organe ohne Granulome.
2	Haushuhn G. domesticus	EZ reduziert; multiple, bis zu kirschkerngroße Granulome in der Leber, Milz und subserös in der Darmwand des Duodenums.
3	Haushuhn G. domesticus	EZ reduziert; Organe makroskopisch o. b. B.
4	Haushuhn G. domesticus	EZ reduziert; multiple, disseminierte Granulome in der Leber, sowie multiple, stecknadelstichfeine Granulome in der Milz.
5	Haushuhn G. domesticus	EZ reduziert; multiple, disseminierte Granulome in Leber und Milz.
6	Haushuhn G. domesticus	EZ reduziert; multiple, disseminierte Granulome in Leber und Milz.
7	Haushuhn G. domesticus	EZ reduziert; Organe makroskopisch o. b. B.
8	Haushuhn G. domesticus	EZ reduziert, multiple, disseminierte Granulome in Leber und Milz.
9	Haushuhn G. domesticus	EZ reduziert; zwei, ca. stecknadelkopfgroße Granulome in der Leber.

Tabelle 9 OSA von Patientenplasmen mit dem Standardantigen Tuberculognost (T) und M. intracellulare Serovar 8 (8)

Nr	Spezies	T	8		Nr	Spezies	T	8
1	Roter Ibis	–	–		49	Chileflamingo	–	–
2	Roter Ibis	–	–		50	Chileflamingo	–	–
3	Roter Ibis	–	+		51	Chileflamingo	–	–
4	Roter Ibis	–	+		52	Chileflamingo	–	+
5	Roter Ibis	–	–		53	Chileflamingo	–	+
6	Roter Ibis	–	–		54	Chilelamingo	–	+
7	Roter Ibis	–	–		55	Chileflamingo	–	–
8	Roter Ibis	–	+		56	Chileflamingo	–	+
9	Roter Ibis	–	+		57	Chileflamingo	–	+
10	Roter Ibis	–	+		58	Chileflamingo	–	+
11	Roter Ibis	–	+		59	Chileflamingo	–	+
12	Roter Ibis	–	+		60	Jungfernkranich	–	–
13	Roter Ibis	–	+		61	Jungfernkranich	–	–
14	Weißer Ibis	–	–		62	Jungfernkranich	–	–
15	Weißer Ibis	–	+		63	Jungfernkranich	–	–
16	Weißer Ibis	–	–		64	Jungfernkranich	–	–
17	Weißer Ibis	–	+		65	Jungfernkranich	–	–
18	Weißer Ibis	–	+		66	Kronenkranich	–	–
19	Weißer Ibis	–	–		67	Kronenkranich	–	–
20	Weißer Ibis	–	+		68	Kronenkranich	–	+
21	Weißer Ibis	–	–		69	Reiher	–	–
22	Weißer Ibis	–	+		70	Reiher	–	+
23	Weißer Ibis	–	–		71	Graureiher	–	+
24	Hl. Ibis	–	+		72	Graureiher	–	+
25	Hl. Ibis	+	+		73	Graureiher	–	–
26	Hl. Ibis	–	+		74	Graureiher	–	–
27	Schwarzkopf Ibis	–	+		75	Graureiher	–	–
28	Schwarzkopf Ibis	–	+		76	Graureiher	–	–
29	Schwarzkopf Ibis	–	+		77	Graureiher	–	+
30	Schwarzkopf Ibis	–	+		78	Graureiher	–	–
31	Schwarzkopf Ibis	–	+		79	Graureiher	–	–
32	Schwarzkopf Ibis	–	+		80	Graureiher	–	–
33	Schwarzkopf Ibis	–	+		81	Nachtreiher	–	–
34	Schwarzkokf Ibis	–	+		82	Reiherbastard	–	+
35	Schwarzkopf Ibis	–	+		83	Reiherbastard	–	+
36	Löffler	–	–		84	Weißstorch	–	+
37	Löffler	–	–		85	Weißstorch	–	+
38	Löffler	–	–		86	Geierperlhuhn	–	+
39	Löffler	–	+		87	Geierperlhuhn	–	+
40	Löffler	–	–		88	Ente	–	+
41	Zwergflamingo	–	–		89	Brandgans	–	–
42	Zwergflamingo	–	–		90	Kaisergans	–	+
43	Zwergflamingo	–	–		91	Kaisergans	–	+
44	Zwergflamingo	–	–		92	Diamantfasan	–	+
45	Rosa Flamingo	–	–		93	Königsfasan	+	G
46	Rosa Flamingo	–	+		94	Königsfasan	–	+
47	Rosa Flamingo	–	+		95	Königsfasan	–	+
48	Chileflamingo	–	+		96	Königsfasan	–	+

–: keine Reaktion, +: Reaktion, G: Geleebildung

4.4 Langsamagglutination (Gruber-Widal)

Obwohl die Antikörperbildung in Hühnern mit nur einem Serovar induziert wurde, traten bei der Langsamagglutination erhebliche Kreuzreaktionen mit heterologen Serovaren auf. Teilweise wiesen heterologe und homologe Reaktionen denselben Titer auf (siehe Tabelle 10).

Zusätzliche Schwierigkeiten ergaben sich beim Plasma mit den Antikörpern gegen Serovar 4. Hier waren nach 24 h Geleebildungen bei den Seren aller experimentellen Probanden aufgetreten, die das Ablesen der Reaktionen in den Titrationsreihen beeinträchtigten. Eine Inaktivierung des Plasmas bei 56 °C für 30 min unterdrückte die Zunahme der Viskosität in den Verdünnungen nur gering. Somit war die Bestimmung der Antikörpermenge bei Serovar 4 ungenau bzw. unvollständig. Das gilt auch für die Kreuzreaktionen mit diesen Antikörpern.

Selbst mit dem Diavert (Leitz) war das Ablesen der Reaktionen im Mikrosystem schwierig, weil oft nicht entschieden werden konnte, ob ein Bodensatz durch Agglutinate oder nur durch Sedimentation der Antigenpartikel gebildet wurde.

Tabelle 10 Langsamagglutination (Gruber-Widal), Titerbestimmung

Antikörper Serovar: / Antigen:	1	2	3	4	6	8	9	NaCl
Serovar 1	1: 512	1: 256	1: 256		1: 512	1: 32	1: 32	–
Serovar 2	1: 64	1: 512	1: 128		1:1024	1: 16	1: 64	–
Serovar 3	1: 32	1: 512	1:1024		1: 512	1: 16	1: 128	–
Serovar 4	1: 64	1: 64	1: 32	1: 512	1:4096	1: 16	1: 4	–
Serovar 6	1: 256	1: 256	1: 64		1:4096	1:1024	1: 32	–
Serovar 8	1: 128	1: 256	1: 64	1: 64	1:4096	1:4096	1: 64	–
Serovar 9	1: 64	1: 512	1: 512		1: 64	1: 64	1:1024	–

–: keine Reaktion

4.5 Monovalente Antikörper

Da für die Serovarbestimmung monovalentes Plasma benötigt wird, wurden die Antikörper aus 3.3.2 mit dem Antigen des M. intracellulare Serovar 9 in vier verschiedenen Verhältnissen abgesättigt. Die Antikörper gegen M. avium Serovar 1, 3 und M. intracellulare 4, 9 wiesen nach einer Absorption mit Antigen Serovar 9 im Verhältnis 1 : 2,5 (Plasma : Antigen Serovar 9) Monovalenz auf. Die Antikörper von M. intracellulare Serovar 6 waren erst nach einer Absättigung von 1 : 3 monovalent. Die mit M. intracellulare Serovar 9 (1 : 2,5) absorbierten Antikörper von M. avium Serovar 2 und M. intracellulare Serovar 8 zeigten nach einer zweiten Absorption mit Antigen Serovar 3 bzw. 6 im Verhältnis 1 : 1, monovalente Reaktionen (siehe Tabelle 11).

4.6 Wachstum der Feldstämme und Suspendierung der Isolate

Ca. 6–8 Wochen nach der Beimpfung der Nährmedien wiesen 70 von 101 Kulturansätzen ein Wachstum von Mykobakterien auf. Nach weiteren 4 Wochen hatte sich bei 70 Stämmen ein ausreichender Bakterienrasen gebildet, der abgeschwemmt wurde. Autoagglutinationen traten nicht auf (Kontrolle mit physiol. Kochsalzlösung, siehe Tabelle 12).

Tabelle 11 Herstellung monovalenter Antikörper

Antikörper absorbiert mit Antigen 9 im Verhältnis 1 : 1 (Serum : Antigen)

Antikörper: \ Antigen Serovar:	1	2	3	4	6	8	9
Serovar 1 (1 : 32)	++	+	+	+	+	+	+
Serovar 2 (1 : 32)	+	++	+	–	+	–	+
Serovar 3 (1 : 64)	+	–	++	–	–	–	+
Serovar 4 (1 : 32)	+	–	+	+	–	–	+
Serovar 6 (1 : 128)	+	–	+	–	+	–	+
Serovar 8 (1 : 64)	+	–	+	–	+	+	+
Serovar 9 (1 : 64)	+	–	+	–	–	–	+

Antikörper absorbiert mit Antigen 9 im Verhältnis 1 : 2 (Serum : Antigen)

Antikörper: \ Antigen Serovar:	1	2	3	4	6	8	9
Serovar 1 (1 : 32)	++	–	+	–	+	–	+
Serovar 2 (1 : 32)	+	+	+	–	+	–	+
Serovar 3 (1 : 64)	+	–	+	–	–	–	+
Serovar 4 (1 : 32)	+	–	+	+	–	–	+
Serovar 6 (1 : 128)	+	–	+	–	+	–	+
Serovar 8 (1 : 64)	+	–	+	–	+	+	+
Serovar 9 (1 : 64)	+	–	+	–	–	–	+

++: starke Reaktion, +: Reaktion, –: keine Reaktion

Fortsetzung Tabelle 11 Herstellung monovalenter Antikörper

Antikörper absorbiert mit Antigen 9 im Verhältnis 1 : 2,5 (Serum : Antigen)

Antikörper: \ Antigen Serovar:	1	2	3	4	6	8	9
Serovar 1 (1 : 32)	+	−	−	−	−	−	−
Serovar 2 (1 : 32)	−	+	+	−	−	−	−
Serovar 3 (1 : 64)	−	−	+	−	−	−	−
Serovar 4 (1 : 32)	−	−	−	+	−	−	−
Serovar 6 (1 : 128)	−	−	−	−	+	−	+
Serovar 8 (1 : 64)	−	−	−	−	+	+	−
Serovar 9 (1 : 64)	−	−	−	−	−	−	+

Antikörper absorbiert mit Antigen 9 im Verhältnis 1 : 3 (Serum : Antigen)

Antikörper: \ Antigen Serovar:	1	2	3	4	6	8	9
Serovar 1 (1 : 32)	+	−	−	−	−	−	−
Serovar 2 (1 : 32)	−	+	+	−	−	−	−
Serovar 3 (1 : 64)	−	−	−	−	−	−	−
Serovar 4 (1 : 32)	−	−	−	−	−	−	−
Serovar 6 (1 : 128)	−	−	−	−	+	−	−
Serovar 8 (1 : 64)	−	−	−	−	+	+	−
Serovar 9 (1 : 64)	−	−	−	−	−	−	+

+: Reaktion, −: keine Reaktion

Fortsetzung Tabelle 11 Herstellung monovalenter Antikörper

Mit Antigen 9 im Verhältnis 1 : 2,5 abgesättigte Antikörper 2, absorbiert mit Antigen 3 im Verhältnis 1 : 1

Antigen Serovar:	1	2	3	4	6	8	9
Antikörper 2	–	+	–	–	–	–	–

Mit Antigen 9 im Verhältnis 1 : 2,5 abgesättigte Antikörper 8, absorbiert mit Antigen 6 im Verhältnis 1 : 1

Antigen Serovar:	1	2	3	4	6	8	9
Antikörper 8	–	–	–	–	–	+	–

+: Reaktion, –: keine Reaktion

4.7 Serotypenbestimmung (siehe Tabelle 12)

Bei der Serotypisierung der 70 Feldstämme wurde festgestellt:

M. avium Serovar 2	= 62 mal
M. avium Serovar 2, 3	= 8 mal
	= 70 mal

Eine im Forschungsinstitut Borstel, Institut für experimentelle Biologie und Medizin, vorgenommene Kontrollbestimmung ergab hingegen:

Spontanagglutinationen	= 8 mal
M. avium Serovar 2	= 24 mal
M. avium Serovar 2 und M. intracellulare Serovar 8	= 1 mal
M. avium Serovar 2, 3	= 12 mal
M. avium Serovar 2, 3 und M. intracellulare Serovar 6	= 10 mal
M. avium Serovar 2, 3 und Teilreaktionen mit M. intracellulare Serovar 6, 9	= 15 mal
	= 70 mal

Tabelle 12 Wachstum und Serotypisierung der Isolate

Nr	Spezies	G	E	B	Nr	Spezies	G	E	B
1	Küstenreiher	+	2	2	41	Bronzegans	+	2	2,3
2	Küstenreiher	–	–	–	42	Haushuhnn	+	2	2
3	Küstenreiher	+	2	2	43	Haushuhn	+	2	2
4	Küstenreiher	+	2	2,3,6	44	Haushuhn	+	2	2
5	Küstenreiher	+	2	2,3,6	45	Haushuhn	+	2	2,3
6	Seidenreiher	+	2	2	46	Haushuhn	+	2,3	2,3
7	Seidenreiher	+	2	2	47	Haushuhn	+	2	2
8	Seidenreiher	+	2	2	48	Haushuhn	+	2	2
9	Seidenreiher	+	2	2,3	49	Haushuhn	+	2,3	2,3*
10	Seidenreiher	+	2	2.3,6	50	Haushuhn	+	2.3	2,3*
11	Seidenreiher	–	–	–	51	Haushuhn	+	2	2,3*
12	Seidenreiher	–	–	–	52	Haushuhn	+	2	2,3*
13	Hl. Ibis	+	2	2	53	Haushuhn	+	2	2,3*
14	Hl. Ibis	+	2	2	54	Haushuhn	+	2	2,3*
15	Hl. Ibis	+	2	2	55	Haushuhn	+	2	2,3*
16	Hl. Ibis	+	2	2	56	Haushuhn	+	2	2,3*
17	Hl. Ibis	+	2	0	57	Haushuhn	+	2	2,3*
18	Hl. Ibis	+	2	2,3,6	58	Haushuhn	+	2	2,3*
19	Hl. Ibis	–	–	–	59	Haushuhn	+	2	2,3*
20	Hl. Ibis	–	–	–	60	Haushuhn	+	2	2,3*
21	Hl. Ibis	–	–	–	61	Haushuhn	+	2	2,3
22	Hl. Ibis	–	–	–	62	Haushuhn	+	2	2,3
23	Hl. Ibis	–	–	–	63	Haushuhn	+	2	2,8
24	Hl. Ibis	–	–	–	64	Haushuhn	–	–	–
25	Hl. Ibis	–	–	–	65	Haushuhn	–	–	–
26	Weißhalsibis	+	2	2,3,6	66	Haushuhn	–	–	–
27	Weißhalsibis	–	–	–	67	Haushuhn	–	–	–
28	Brillenibis	–	–	–	68	Haushuhn	–	–	–
29	Kranich	–	–	–	69	Haushuhn	–	–	–
30	Kranich	+	2	2	70	Haushuhn	–	–	–
31	Jungfernkranich	+	2	2,3	71	Haushuhn	–	–	–
32	Andensichler	+	2	2,3,6	72	Haushuhn	–	–	–
33	Kappensäger	+	2	2	73	Haushuhn	–	–	–
34	Sichelente	+	2	2	74	Haushuhn	–	–	–
35	Versicolorente	+	2	0	75	Haushuhn	–	–	–
36	Blauflügelente	+	2	2,3,6	76	Bankiva-Huhn	+	2	2,3*
37	Mandarinente	+	2	0	77	Helmperlhuhn	+	2	2,3
38	Brautente	–	–	–	78	Helmperlhuhn	+	2	2
39	Kolbenente	+	2,3	0	79	Helmperlhuhn	–	–	–
40	Kanadagans	+	2	0	80	Helmperlhuhn	+	2	2

Fortsetzung Tabelle 12 Wachstum und Serotypisierung der Isolate

Nr	Spezies	G	E	B	Nr	Spezies	G	E	B
81	Elliotfasan	+	2	0	91	Rote Erdtaube	+	2,3	2,3,6
82	Goldfasan	+	2	2	92	Krähe	+	2	2,3*
83	Pfau	+	2	2,3,6	93	Saatkrähe	+	2	2
84	Pfau	–	–	–	94	Sakerfalke	+	2	2
85	Textorweber	+	2,3	2,3	95	Turmfalke	–	–	–
86	Textorweber	–	–	–	96	Lannerfalke	+	2	2,3
87	Lachtaube	+	2	0	97	Lannerfalke	+	2,3	2,3
88	verwilderte Stadttaube	+	2	2,3*	98	Lannerfalke	+	2	2,3
89	Rassetaube	+	2	2,3*	99	Lannerfalke	+	2	2
90	Fruchttaube	+	2,3	2,3,6	100	Lannerfalke	–	–	–
					101	Lannerfalke	+	2	0

G: gewachsen, B: Ergebnisse aus Borstel, E: Eigene Ergebnisse
0: Spontanagglutination
2,3*: Serovar 2 und 3, z. T. Reaktion mit Serovar 6 und 9

5 Diskussion

Das Interesse an der Bekämpfung der aviären Mykobakteriose in zoologischen Gärten und generell bei den Psittaciformes hat in den letzten Jahren zugenommen.

Die von der neueren Tierschutzgesetzgebung geforderte artgerechte Unterbringung der Vögel in Volieren verhindert eine Desinfektion und kann durch Anreicherung der Keime in natürlich gestalteten Volieren zur Infektion weiterer Vögel führen.

Für die Bekämpfung der aviären Tuberkulose bieten sich serologische Methoden zur Diagnose am lebenden Tier an. Es ist weiter notwendig, die bei der kulturellen Anzüchtung isolierten Stämme in die verschiedenen Serovare einzuordnen. Die Serotypisierung ist einerseits zur Kontrolle der serologischen Diagnose, andererseits zur Klassifizierung der Mykobakterienstämme hinsichtlich ihres Vorkommens und ihrer Pathogenität wünschenswert.

Ein Standardantigen, M. avium Serovar 2, wird seit 1976 von der Firma Biowet, Polen, unter dem Namen "Tuberculognost" angeboten. Antigensuspensionen anderer Serovare, wie M. avium Serovar 1, 3 und M. intracellulare Serovar 4, 6, 8, 9 können beim Geflügel auch eine Rolle spielen, stehen aber derzeit kommerziell nicht zur Verfügung. Die von Dr. Schröder aus dem Forschungsinstitut Borstel, Institut für experimentelle Biologie und Medizin, überlassenen Laborstämme M. avium Serovar 1, 2, 3 und M. intracellulare Serovar 4, 6, 8, 9 wurden in Anlehnung an die Arbeiten von HILLER (1961), RICHTER (1964), ANZ et al. (1969) sowie GÖTZ (1984) zur Antigenherstellung verwendet.

Um festzustellen, welche Kombination zu einer stabilen Antigensuspension führt, wurden mehrere Nährböden und Pufferlösungen parallel untersucht. Dabei zeigte sich, daß die aus Tarschis-Blutagar gewonnenen Suspensionen vermehrt Spontanagglutinationen aufwiesen. HILLER (1961) führte dies auf eine hohe Wärmeeinwirkung bei der Abtötung der Mykobakterien zurück. Bei GÖTZ (1984) traten hingegen bei Verwendung desselben Agars auch ohne Hitzeabtötung Agglutinationen auf. Die eigenen Untersuchungen ergaben, daß sowohl die Suspensionen vom Middlebrook 7H10 Agar mit Middlebrook OADC Enrichment als auch die vom Löwenstein-Jensen Eiernährboden trotz 80 °C Wärmeeinwirkung beim Abtöten stabil blieben. Die bei MOSES et al. (1943), KARLSON et al. (1950), PROCHOROV (1958), NASSAL (1963) und BETKE (1964) durch Autoagglutinationen erschwerte Herstellung stabiler Suspen-

sionen kam bei den hier verwendeten Labor- und Feldstämmen nicht vor. Allerdings traten beim Versuch, durch Einfrieren bzw. Lyophilisieren die eigenen Antigensuspensionen zu konservieren, nach dem Auftauen bzw. Rehydrieren Spontanagglutinationen auf. Die Aufbewahrung im Kühlschrank ergab keine Beeinträchtigung und bestätigte damit die Ergebnisse von HILLER (1961) und GÖTZ (1984).

Über die Haltbarkeit der Antigensuspensionen gibt es verschiedene Auffassungen. Tuberculognost soll nach Herstellerangaben auf der Flasche ca. 12 Monate haltbar sein. Die Suspensionen von HILLER (1961) waren manchmal schon nach 3 Wochen nicht mehr brauchbar, andere jedoch über 6 Monate verwendbar. Die Antigene von NASSAL (1963) sowie die eigenen Antigene hatten ebenso wie das Tuberculognost eine Haltbarkeit von ca. 1 Jahr. Die früher von den Behringwerken hergestellten Standardantigene waren nach KÖSTERS (1984) einige Jahre haltbar.

Zur Abschwemmung der Antigene von den Nährböden bewährte sich der Puffer nach ANZ et al. (1969) als klare Lösung. Der Puffer nach GÖTZ (1984) wurde durch die Zugabe von Tween 80 getrübt. Der trübe Hintergrund erschwerte die Beurteilung der Reaktion, da fehlendes Aufklaren eine unvollständige Agglutination vortäuschen kann. Die durch die Laborstämme im Haushuhn gebildeten spezifischen Antikörper zeigten sowohl bei der OSA als auch bei der Gruber-Widal-Reaktion mit homologen und heterologen Antigenen Kreuzreaktionen. Die bei der OSA teilweise aufgetretenen Zeitverzögerungen können ein Hinweis auf Kreuzreaktionen sein. Die Größe der Agglutinate war dagegen willkürlich verteilt.

Bei der Gruber-Widal-Reaktion (siehe Tabelle 10) zeigten die heterologen Antikörpermengen teilweise dieselbe Höhe wie die homologen. Die mit dem Plasma Serovar 4 aufgetretenen Geleebildungen, besonders in den hohen Verdünnungsstufen, traten mehrfach auch bei Feldseren bzw. -plasmen auf. Sie können derzeit noch nicht erklärt werden.

BLOBEL und SCHLIESSER (1985) führten die Kreuzreaktionen sowohl auf gemeinsame Antigene der Mykobakterien untereinander als auch auf solche der mit ihnen nahe verwandten Bakterien (Nocardien) zurück. Dies stimmt mit der Tatsache überein, daß M. avium und M. intracellulare durch biochemische Untersuchungen nur schwer voneinander zu trennen sind. Die hohe Rate der Kreuzreaktionen hat den Vorteil, daß sich unter Umständen mit einem Antigen Antikörper verschiedener Serovare erfassen lassen. Dies war mit dem Tuberculognost teilweise der Fall.

Nach den bisherigen Erfahrungen treten Kreuzreaktionen zwischen M. avium Serovar 2 und M. intracellulare Serovar 8 am wenigsten häufig auf (siehe Tabelle 9). Es sind hier noch weitere Untersuchungen notwendig. Die Antigenstämme reagierten hinsichtlich ihrer Kreuzreaktionen mit Antikörpern anderer Serovare unterschiedlich. Ein Stamm von M. avium Serovar 2 aus Borstel wies z. B. eine höhere Spezifität als das Standardantigen Tuberculognost auf. Dagegen reagierte der andere Stamm von M. avium Serovar 2 ähnlich wie Tuberculognost. Als Suchantigene sind solche Stämme den spezifischeren vorzuziehen. Bei der Bestimmung des Serovars eines Feldstammes hingegen wirken Kreuzreaktionen störend und müssen durch Absorption entfernt werden.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, daß die Absorption mit nur einem Antigen nicht immer ausreichend und eine zweite Absorption mit einem anderen Antigen erforderlich ist. Bei der Absättigung wurde die Methode nach GADEN (1976) bzw. nach Castellani (WINKLE, 1979) nicht angewendet, weil dabei eine erhebliche Menge an Mykobakterien benötigt wird. Es wurden deshalb Mykobakteriensuspensionen mit einer optischen Dichte von 0,6 verwendet, und dafür größere Volumina benutzt. Dies birgt den Vorteil, daß durch die höhere Verdünnung ein Teil der kreuzreagierenden Antikörper schon durch die Konzentrationsabnahme unwirksam wird. Nach monovalenter Einstellung der Antikörper konnte die Serotypisierung nach SCHAEFER (1965) mit der Langsamagglutination problemlos durchgeführt werden. Das von GADEN (1976) entwickelte Mikrosystem erlaubte im vorliegenden Fall kein exaktes Ablesen der Reaktionsergebnisse. Deshalb wurde es trotz gewisser Vorteile - wie kleine Serum- und Antigenmengen sowie geringer Zeitaufwand - nicht weiter verwendet.

Die Spezifität der selbsthergestellten Antikörper war nach der Absorption hoch. Dagegen war die Spezifität der Antikörper von Patientenseren bzw. -plasmen in der OSA gegenüber M. avium Serovar 1, 2, 3 und M. intracellulare Serovar 4, 6, 8, 9 niedrig. Die Empfindlichkeit der Agglutinationsantigene gilt generell als gering. So benötigte HILLER (1961) bei seinen Antigenen eine Konzentration von 10 Vol% für einen deutlichen Reaktionsverlauf. Die nach EG-Richtlinien hergestellten eigenen Antigene agglutinierten noch bis zu einer Konzentration von 0,1 Vol% und wiesen somit eine hohe Empfindlichkeit auf.

Die pathologisch-anatomische Untersuchung der an Tuberkulose erkrankten Vögel, aus denen später die Feldstämme isoliert wurden, zeigte bei zwei Weißhalsibissen Granulome am Schnabelwinkel. Bei einem Küstenreiher, drei

Seidenreihern und zwei Hl. Ibissen bildeten sich Granulome am Magenausgang. Diese Veränderungen sind vermutlich noch nicht beschrieben worden. Histologisch zeigten sich Nekroseherde, die mit Riesenzellen, vor allem Fremdkörperriesenzellen, demarkiert waren. Lymphozyten kamen kaum vor. Bindegewebsfasern ließen sich nur geringgradig vermehrt nachweisen.

Die Feldstämme wurden auf Middlebrook 7H10 Agar mit Middlebrook OADC Enrichment angezüchtet und vorher in den meisten Fällen nach BEERWERTH (1967) dekontaminiert. Die zu Anfang verwendete Dekontamination mit Schwefelsäure wurde nach dem von FORSTER (1987) durchgeführten Vergleich beider Dekontaminationsmethoden durch das einfachere Beerwerth-Verfahren ersetzt. Im Gegensatz zu FORSTER (1987) wurde bei den Nichtpapageienvögeln ein Wachstum der Mykobakterien von ca. 70 % beobachtet. Nach SCHRÖDER (1986) ist eine Aufbewahrung mykobakterienhaltiger Gewebeproben bei −20 °C ungeeignet. Die eigenen Gewebeproben wurden jedoch alle bei dieser Temperatur gelagert. Eine Anzüchtungsrate von 70,7 % ist nach SCHRÖDER (1986) zufriedenstellend, weil auch nach sofortiger Weiterbehandlung des Untersuchungsmaterials keine höheren Prozentsätze erzielt werden.

Von den 70 Mykobakterienisolaten wurden 62 Stämme dem M. avium Serovar 2 zugeordnet. Diese Ergebnisse bestätigen erneut, daß in der Bundesrepublik Deutschland M. avium Serovar 2 am häufigsten vorkommt. Die restlichen acht Kulturen ergaben eine Mischreaktion von M. avium Serovar 2 und 3. Auch andere Autoren haben das Auftreten von Mischkulturen in verschiedenen Kombinationen belegt. So stellte NEUMEIER (1974) bei einem Rind das parallele Auftreten von M. avium Serovar 2 und 3 fest. M. tuberculosis und gleichzeitig M. intracellulare wurden von KOVACS (1962) in menschlichem Sputum nachgewiesen. SCHAEFER (1965) isolierte von einem an Silikose erkrankten Menschen sowohl M. intracellulare Serovar 8, als auch M. avium Serovar 1. Bei dem Versuch beide Serovare zu trennen, stellte er fest, daß einzelne Keime Antigene beider Serovare besitzen. Es handelte sich seiner Meinung nach entweder um eine genetische Kombination der beiden Serovare, die während des langen Zusammenseins der beiden Stämme auftrat, oder um eine Verbindung beider Antigene in der Kultur von Anfang an.

Die Kontrolle der eigenen Ergebnisse durch das Forschungsinstitut Borstel wies keine schwerwiegenden Unterschiede auf. Abweichende Ergebnisse lassen sich durch dort aufgetretene Spontanagglutinationen, sowie durch die Tatsache erklären, daß in Borstel die Antikörper nicht durch Absorption monovalent eingestellt wurden.

Die serologischen Ergebnisse haben gezeigt, daß M. avium Serovar 2, wie durch die Isolationsergebnisse bestätigt, weit verbreitet ist. Kreuzreaktionen mit den Antigenen M. avium Serovar 1, 3 und M. intracellulare Serovar 4, 6, 8, 9 traten immer wieder auf (siehe Tabelle 6), Antikörper gegen M. intracellulare Serovar 8 dagegen besonders bei Zoovögeln (siehe Tabelle 9). Entsprechende Isolate fehlen derzeit noch. Ohne Feldstämme dieses Serovars ist nicht einwandfrei feststellbar, ob es sich vielleicht doch nicht um Kreuzreaktionen, sondern um Infektionen mit dem entsprechenden Serovar handelt. Erste Sektionsergebnisse von Vögeln mit Antikörpern nur gegen M. intracellulare Serovar 8 im Plasma haben gezeigt, daß neben völlig unauffälligen Befunden bei einer Vogelart schwere Organschäden bei anderen festzustellen sind. Bei Säugetieren (Kontakt zu Vögeln mit Antikörpern gegen M. intracellulare Serovar 8) wurden dieselben Antikörper nachgewiesen. Bei drei Elenantilopenseren zeigten sich z. B. nicht nur Reaktionen mit M. intracellulare Serovar 8, sondern auch mit M. avium Serovar 3 und M. intracellulare Serovar 4, 9, während ein Steinbockserum mit M. avium Serovar 1, 3 und M. intracellulare Serovar 8, 9 agglutinierte. Die Tuberkulinisierung dieser Tiere mit bovinen und aviären Sensitinen verlief reaktionslos. Die von FREERKSEN und LAUTERBACH (1960) sowie SCHLIESSER (1976, 1978) beschriebene Sensibilisierung durch atypische Mykobakterien war in diesen Fällen nicht nachweisbar.

Nach BLOBEL und SCHLIESSER (1985) ist die Pathogenität von M. intracellulare Serovar 8 unterschiedlich. ANZ et al. (1970) stellten durch Sensibilisierung von Meerschweinchen fest, daß die Serovare 4, 5, 6, 8 und 9 näher zu M. avium als zu M. intracellulare zu stellen sind. Auch WAYNE und KUBICA (1986) nehmen an, daß diese, auch als Intermediärgruppe bezeichneten Stämme, M. avium zuzuordnen sind. Die Pathogenität für Hühner, wie auch möglicherweise für andere Vogelarten, ist jedoch uneinheitlich. Erste eigene Untersuchungsergebnisse sind in diese Richtung zu interpretieren. Es wird deshalb die Meinung von SCHRÖDER (1985) unterstützt, daß die Serovare 4–9 M. avium zuzuordnen sind. Auch hier sind weitere Untersuchungen notwendig.

Literaturangaben (BLOBEL und SCHLIESSER, 1985) sprechen dafür, daß M. intracellulare Serovar 8 bei Säugetieren und Vögeln weit verbreitet ist. Es wurde außerdem im Wasser sowie bei Grasfröschen (Rana temporaria) nachgewiesen (KAZDA und HOYTE, 1972). Diese Frösche spielen u. a. als Reservoir eine Rolle, da der Erreger 5 Monate in der Froschleber überleben und ausgeschieden werden kann, ohne daß die Amphibien selbst erkranken.

Gemäß dem Tierseuchengesetz, Verordnung über Sera, Impfstoffe und Antigene (Tierimpfstoff-VO, letzte Fassung vom 12.04.1984, BGBl. I., S. 624), bedürfen Mittel, die unter Verwendung von Krankheitserregern hergestellt werden und zur Erkennung von Tierseuchen bestimmt sind (Testantigene), der behördlichen Zulassung. Da solche Testantigene im Falle der aviären Mykobakteriose zur Einzeltier- und Bestandskontrolle notwendig sind, ein kommerzielles Interesse wegen der geringen absetzbaren Menge jedoch nicht zu erwarten ist, erscheint es wünschenswert, daß sie vom Staat hergestellt, vorrätig gehalten und abgegeben werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß mehrere Antigensuspensionen verschiedener Serovare für eine serologische Diagnostik der aviären Tuberkulose notwendig sind und in einem bakteriologischen Labor routinemäßig hergestellt werden können. Die Anzüchtung der Feldstämme und deren Serotypisierung ist notwendig, um eine Kontrolle der vorher festgestellten Antikörper zu haben. Mit der zunehmenden Bedeutung der Vogelzucht in zoologischen Gärten (auch im Privatbesitz), in denen vor allem auch vom Aussterben bedrohte Vogelarten gezüchtet werden sollen, stellt das Erkennen und Bekämpfen der Mykobakteriose einen Teil der Arterhaltung dar. Auch die dort arbeitenden Menschen sind vor einer Infektion durch Mykobakterien zu schützen.

6 Zusammenfassung

Die Diagnose der aviären Tuberkulose am lebenden Vogel bereitet auch heute noch Schwierigkeiten. Die Objektträgerschnellagglutination stellt in diesem Zusammenhang ein geeignetes Verfahren dar. Hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl brauchbare Mycobacterium (M.) avium- und M. intracellulare-Antigensuspensionen als auch Antikörper mit denselben Stämmen hergestellt.

Das polnische Präparat "Tuberculognost" diente als Standardantigen im Vergleich zu den sieben Laborstämmen (M. avium Serovar 1, 2, 3 und M. intracellulare Serovar 4, 6, 8, 9) aus dem Forschungsinstitut Borstel, Institut für experimentelle Biologie und Medizin.

Die Antigenstämme wurden auf drei verschiedenen Nährböden angezüchtet, mit zwei verschiedenen Pufferlösungen abgeschwemmt und durch Wärmeeinwirkung abgetötet. Der Middlebrook 7H10 Agar mit Middlebrook OADC Enrichment und der Puffer nach ANZ et al. (1969) erwiesen sich als besonders geeignet. Die Reaktionen der Antigensuspensionen wurden sowohl mit selbsthergestellten Antikörpern, als auch mit Patientenseren bzw. -plasmen untersucht. Die Agglutinationen mit den homologen und heterologen Laborstämmen zeigten erhebliche Kreuzreaktionen, die auch bei den Patientenseren auftraten. Während Kreuzreaktionen mit den verschiedenen Serovaren bei den Suchantigenen vorteilhaft sind, müssen sie bei der Serotypisierung von Feldstämmen durch Absorption verhindert werden. Mit den durch Absorption monovalent gemachten Antikörpern gelang die Serotypisierung von 70 Mykobakterienstämmen aus 101 an Tuberkulose erkrankten Vögeln. Dabei wurde 62 mal M. avium Serovar 2, und 8 mal M. avium Serovar 2 und 3 nachgewiesen.

Avian Mycobacteriosis - Serodiagnosis and Identification of the Causative Agent

Summary

The diagnosis of avian tuberculosis in live birds is still difficult. The slide agglutination test has been proven a suitable method and was used in this study. M. avium and M. intracellulare antigen suspensions and antibodies from the same strains were prepared.

Tuberculognost, a Polish preparation was used as a standard antigen and compared with seven laboratory strains (M. avium Serovar 1, 2, 3 and M. intracellulare 4, 6, 8, 9) supplied by the Research Institut for Experimental Biology and Medicine in Borstel.

The antigen strains were cultured on three different media, harvested from the surface by rinsing with two different buffers and inactivated by heat. Middlebrook 7H10 Agar with Middlebrook OADC Enrichment and buffer according to ANZ et al. (1969) was the most suitable combination tested. The antigen suspensions agglutinated with home-made antibodies and with sera or plasma from different patients.

Considerable cross-reactions were seen with heterologous and homologous antibodies and antigens as well as with various field sera or plasmas.

While cross-reactions can be desirable for tracing antibodies against different serovars, they should be eliminated for the serotyping of field strains. Monovalent antibodies were produced and used for the identification of 70 field strains out of 101 tuberculous birds. 62 of the strains belong to M. avium Serovar 2 and eight cases consist of a mixed culture of M. avium Serovar 2 and 3.

Diagnóstico Serológico e Identificación de Cepas Bacterianas de Micobacteriosis Aviar

Resumen

El diagnóstico de la tuberculosis aviar sigue planteando problemas en la actualidad. La aglutinación rápida en portaobjetos representa en este respecto un procedimiento adecuado. En lo referente a esta tarea, se prepararon tanto suspensiones útiles de Mycobacterium avium y de Myobacterium intracellulare, como anticuerpos contra las mismas cepas.
El antígeno polaco "Tuberculognost" sirvió como standard para la comparación de las 7 cepas de laboratorio (Mycobacterium avium serovar 1, 2 y 3, y Mycobacterium intracellulare serovar 4, 6, 8 y 9) procedentes del Instituto de Investigación Borstel, Instituto de Biologiá y Medicina Experimental.
Las cepas de antígenos se aislaron usando 3 cultivos diferentes, se aplicaron dos soluciones tampón diferentes y se las inactivaron mediante calor. El Agar Middlebrook 7H10 enriquecido con Middlebrook OADC y el tampón según ANZ et al. (1969) demostraron, que están medios especialmente adecuados. Se investigaron las reacciones de las suspensiones de antígenos tanto con anticuerpos autofabricados como con sueros y plasmas de campo. Las aglutinaciones con las cepas de laboratorio homólogas y heterólogas mostraron reacciones "cruzadas" considerables, las cuales también hicieron su aparición en los sueros de campo. Mientras que las reacciones cruzadas con los diferentes serovares resultan ventajosas en el caso de los antígenos pilotos no es así en la serotipificación de cepas de campo, donde deben evitarlas mediante la absorción.
Con los anticuerpos que se han convertido en monovalentes mediante la absorción, se logró la serotipificación de 70 cepas de micobacterias de 101 aves afectadas de micobacterosis. Allí se comprobó que aparecía 62 veces el M. avium Serovar 2, y 8 veces el M. avium Serovar 2 y 3.

7 Literaturverzeichnis

Anz W., Meissner G.
Serotypen von Stämmen der aviären Mykobakteriengruppe, isoliert von Mensch und Tier
Prax. Pneumol. 23, 4: 221-230 (1969)

Anz W., Lauterbach D., Meissner G., Willers I.
Vergleich von Sensitin-Testen an Meerschweinchen mit Serotyp und Hühnervirulenz bei M. avium- und M. intracellulare-Stämmen
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 215: 536-549 (1970)

Anz W., Meissner G.
Vergleichende Virulenzprüfungen am Huhn von transparenten und opaken Kolonien aus Stämmen der aviären Mykobakteriengruppe verschiedener Serotypen
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 221: 334-342 (1972)

Anz W., Meissner G., Röder U.
Serologische Untersuchungen an atypischen Mykobakterien mittels der Agglutinationsmethode
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. 211: 530-550 (1969)

Bailey W.R., Scott E.G.
Diagnostic Microbiology
Second Edition, The C. V. Mosby Company, Saint Louis (1966)

Beerwerth W.
Die Züchtung vom Mykobakterien aus dem Kot der Haustiere und ihre Bedeutung für die Epidemiologie und Bekämpfung der Tuberkulose
Prax. Pneumol. 21, 4: 189-202 (1967)

Beerwerth W., Kessel U.
Mykobakterien in der Umwelt von Mensch und Tier
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 235: 177-183 (1976)

Bennedsen J.
Circulating Antibodies in Experimental Mycobacterial Infections Demonstrated by Immunofluorescence
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 68: 262-272 (1966)

Bennedsen J.
The Specificity of Circulating Antibodies in Experimental Infection with Mycobacterium avium Demonstrated by Immunoflorescence
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 72: 330-336 (1968)

Berger W.
Vergleichende Untersuchungen über die Leistungsfähigkeit der Frischblut-Schnellagglutination und der Tuberkulin-Kehllappenprobe bei der Diagnose der Hühnertuberkulose
Vet. Diss., München (1962)

Betke P., Blum H., Graubmann H.-D.
Untersuchungen über die Frischblut-Agglutination zur Diagnose der Hühnertuberkulose
Monatsheft für Vet. Med. 19, 13: 507-509 (1964)

Bönicke R.
Die Differenzierung "atypischer Mykobakterien"
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 205: 260-268 (1967)

Blobel H., Schliesser Th.
Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren
Bd. V, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1985)

Castellani
Zit. n. Winkle S.
Mikrobiologische und serologische Diagnostik
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1979)

Dabrowski J.
Untersuchungen über das Auftreten von Tuberkuloseinfektionen bei Vögeln im zoologischen Garten in Lodz
Med. Weter. Warszawa 32, 8: 464-465 (1976)

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
5. Desinfektionsmittelliste der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG)
Deutsches Tierärzteblatt 10: 653-658 (1987)

Dunbar Fr.P., Pejovic J.,Cacciatore R., Peric-Golia L., Runyon E.F.
Mycobacterium intracellulare Maintenance of Pathogenicity in Relationship to Lyphilisation and Colonial Form
Scand. J. Resp. Dis. 49: 153-162 (1968)

EG-Richtlinien für "Salmonella pullorum" Antigene
Union Economique Benelux SW/PTDS
Commission Spéciale pour la Santé Publique
Sous-Comission "Viandes"
Groupe de Travail "Bétail Viánt"
Papel No. 3212 VI/71-D

Engel H. W. B., Berwald L. G.
A Simplified Agglutination Test for Serologic Typing of Mycobacteria
Amer. Rev. Resp. Dis. 101: 112-115 (1970)

Fachnormenausschuß Medizin
Kulturelle Methoden zur Isolierung von Mykobakterien
Vierte Vorlage (1976)
ISBN 00 58 971/3

Forster F.
Mykobakterien bei Psittaciformes
Vet. Diss., München (1987)

Forster F., Gerlach H., Kösters J.
Mykobakteriose bei Psittaciformes
Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V., VI. Tagung über Vogelkrankheiten, München (1988)

Freerksen E., Lauterbach D.
Über die Auslösbarkeit von Tuberkulin-Reaktionen nach Verfütterung atypischer Mykobakterienstämme beim Rinde
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 180: 217-219 (1960)

Gaden W.
Untersuchung zur serologischen Differenzierung von Mykobakterien
Med. Diss., Kiel (1976)

Gerlach H.
Bacterial Diseases
in: Harrison G.J. and Harrison L.R. (ed.)
Clinical Avian and Surgery
W. B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Mexico City, Rio de Janeiro, Sydney, Tokyo, Hong Kong, 438-440 (1986)

Gillisen G.
Die fluoreszenzserologische Darstellung von Mykobakterien
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 207: 58-62 (1968)

Götz K.
Untersuchungen zur Erkennung und Kontrolle der aviären Tuberkulose in zoologischen Gärten mit Hilfe der Citratplasma-Schnellagglutination
Vet. Diss., München (1984)

Gratzl E., Köhler H.
Spezielle Pathologie und Therapie der Geflügelkrankheiten
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1968)

Hartwig, H.
Infektionen bei Tieren durch aviäre Mykobakterien
Prax. Pneumol. 19: 537-543 (1965)

Heugemühle P.
Untersuchung zur serologischen Subtypisierung von M. tuberculosis mit Hilfe von Phagentypen
Med. Diss., Kiel (1980)

Hiller K.
Die Diagnose der Geflügeltuberkulose mit Hilfe einer Frischblut-Schnellagglutination
Vet. Diss., München (1961)

Hiller K., Schliesser Th., Fink G., Dorn P.
Zur serologischen Diagnose der Hühnertuberkulose
Berl. Münchn. Tierärztl. Wschr. 80, 11: 212-216 (1967)

Holmberg C.A., Henrickson R.V., Malaga C., Schneider R., Gribble D.
Nontuberculous Mycobacterial Disease in Rhesus Monkeys
Vet. Pathol. 19 (Suppl. 7): 9-16 (1982)

Jones W.D., Saito H., Kubica G. P.
Fluorescent Antibody Techniques with Mycobacteria
Amer. Rev. Resp. Dis. 92: 255-260 (1965)

Karlson A.G., Zinober M.R., Feldman W.H.
A Whole Blood, Rapid Agglutination Test for Avian Tuberculosis - A Preliminary Report
Amer. J. Vet. Res. 11: 137-141 (1950)

Kauker E., Rheinwald W.
Untersuchungen über das Vorkommen atypischer Mykobakterien der Gruppe 3 nach Runyon in Einstreu (Sägemehl) und Futter von Schweinen in Nordhessen
Berl. Münchn. Tierärztl. Wschr. 20, 85: 384-387 (1972)

Kazda J., Dornetzhuber V.
Vergleichende Untersuchungen über die Hühnerpathogenität von Mycobacterium avium und Mycobacterium brunense
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 208: 529–538 (1968)

Kazda, J., Hoyte R.
Zur Ökologie von Mycobacterium intracellulare Serotyp Davis
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 222: 506–509 (1972)

Knorpp F.
Zur Frage der Übertragung der Geflügeltuberkulose auf das Rind
Vet. Diss., München (1961)

Kösters J.
Zit. n. Götz K.
Untersuchungen zur Erkennung und Kontrolle der aviären Tuberkulose in zoologischen Gärten mit Hilfe der Citratplasma-Schnellagglutination
Vet. Diss., München (1984)

Kovacs N.
Nichtklassifizierte Mykobakterien
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 184: 46–58 (1962)

Krause E.
Die Einzell-Kultur des Mycobacterium tuberculosis avium – glatte und rauhe Varianten – Tierversuch
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 171: 497–503 (1958)

Kubica G.P., Jones W.D.
Differential Colonial Characteristics of Mycobacteria on Oleic-Acid-Albumin and Modified Coryneal Agars. I. Investigation of Slowly Growing Mycobacteria
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 196: 53–67 (1965)

Kubica G.P., Wayne L.G. (ed.)
The Mycobacteria, A Sourcebook Part B, Microbiological Series
Dekker Verlag, New York (1984)

Kubin M., Matusková E., Kazda J.
Mycobacterium brunense n. sp. Identified as Serotype Davis of Group III (Runyon) Mycobacteria
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 210: 207–211 (1969)

Maffucci A.
Zit. n. Gratzl E., Köhler H. (ed.)
Spezielle Pathologie und Therapie der Geflügelkrankheiten
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1968)
Zbl. Allg. Path. 1, 409 (1890)

Manowska W., Krzywicka H., Janowska J.
Bactericidal Effects of Disinfectants on Some Strains of Tubercle Bacilli
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Ref. 31, 265: 480 (1979)

Marks J., et al.
Zit. n. Bergey's Manual of Determinative Bakt.
Preparation of Agglutination Antigen of Mycobacterium avium
Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 11: 53-54 (1971)

Martins R.R., Walker W.E., Batayias G.E., Gales P. W.
The Production of Type Specific Fluoreszent Antibody for the Identification of Mycobacteria
Amer. Rev. Resp. Dis. 108: 979-982 (1973)

Matsui K., Kawanishi Y.
Preparation of Agglutination Antigen of Mycobacterium avium
Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 11: 53-54 (1971)

Mauch H., Fischer W., Grange J.M., Kardjito T.
The Serodiagnosis of Tuberculosis: A Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and a Solid-Phase Radioimmunoassay
Zbl. Bact. Hyg., I. Abt. Orig A 267: 357-362 (1988)

Meissner G.
Atypische Mykobakterien
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 180: 510-521 (1960)

Montali R.J., Bush M., Freeman R.A.
Effect of Sanitization and Antemortem Screening on the Incidence of Tuberculosis in a Zoo Aviary
Verh. Ber. XXV. Intern. Symp. Erkrank. Zootiere, Wien, 95-99 (1983)

Morgenstern R., Lobsiger Ch.
Sorgen der Schweizer Geflügeltierärzte
Deutsche Geflügelwirtschaft und Schweineproduktion (DGS) 39: 1229-1230 (1987)

Moses H.E., Feldman H.W., Mann F.C.
Mycobacterial Rapid Agglutination Antigens and their Diagnostic Value in Tuberculosis Fowl
Amer. J. of Vet. Res. 4: 390–394 (1943)

Nassal, J.
Untersuchungen über die Brauchbarkeit der Frischblut-Schnellagglutination zur Feststellung der Tuberkulose beim Huhn
Monatsheft für Tierheilk. 15, 6: 109–116 (1963)

Nassal, J., Muser, R.
Geflügeltuberkulose und aviär bedingte Neuinfektionen des Rindes in Baden
Monatsheft für Vet. Med. 16, 4: 121–124 (1961)

Neumeier U.
Serologische Typendifferenzierungen aviärer Mykobakterienstämme isoliert von Tieren
Vet. Diss., Gießen (1974)

Nieberle, Cohrs P.
Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere
Gustav Fischer Verlag, Jena, 123–131 (1961)

Pattyn. S.R.
Serogrouping of Mycobacterium avium and "Battey" Mycobacterium
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 208: 449–452 (1968)

Pattyn, S.R.
Agglutination with Rapidly Growing (Runyon's Group IV) Mycobacteria
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 215: 99–105 (1970)

Pattyn S.R., Portaels F.
Identification and Clinical Significance of Mycobacteria
Zbl. Bakt .Hyg., I. Abt. Orig. A 219: 114–140 (1972)

Prochorov A.V.
Neue Methode der Tuberkulose-Diagnostik bei Hühnern zu Lebzeiten
Zs. Veterinarijn 35, 60 (1958)

Richter W.
Die Entwicklung eines Antigens für die Frischblut-Schnellagglutination zur Diagnose der Geflügeltuberkulose
Arch. für Exper. Vet. Med. 19, 1: 297-299 (1965)

Rivolta G.
Zit. n. Gratzl E., Köhler H. (ed.)
Spezielle Pathologie und Therapie der Geflügelkrankheiten
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1968)

Runyon E.H.
Ten Mycobacterial Pathogens
Tubercle 55, 235-240 (1974)

Saito H., Kubica G.P.
Serologic Studies of Avian-Group III Nonphotochromogen Complex by Agglutination Test
Amer. Rev. Resp. Dis. 98: 47-59 (1968)

Schaefer W.B.
Serologic Identification and Classification of the Atypical Mycobacteria by their Agglutination
Amer. Rev. Resp. Dis. 92: 85-93 (1965)

Schaefer W.B.
Serologic Identification of the Atypical Mycobacteria and its Value in Epidemiologic Studies
Amer. Rev. Resp. Dis. 96: 115-118 (1967)

Schaefer W.B.
Type-Specifity of Atypical Mycobacteria in Agglutination and Antibody Absorption Tests
Amer. Rev. Resp. Dis. 96: 1156-1168 (1967)

Schaefer W.B.
Incidence of the Serotypes of Mycobacterium avium and Atypical Mycobacteria in Human and Animal Diseases
Amer. Rev. Resp. Dis. 97: 18-23 (1968)

Schaefer W.B., Davis Ch.L., Cohn M.L.
Pathogenecity of Transparent, Opaque and Rough Variants of Mycobacterium avium in Chicken and Mice
Amer. Rev. Resp. Dis. 102: 499-506 (1970)

Schliesser Th.
Die epidemiologische Situation bei der Tuberkulose der Tiere nach Tilgung der Rinder-Tuberkulose
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. A 205: 300-308 (1967)

Schliesser Th.
Atypische Mykobakterien bei Tieren
Zeitschr. f. Tuberk. 127, 1/2: 101-108 (1967)

Schliesser Th.
Stand und Bedeutung der Tuberkulose der Haustiere 10 Jahre nach Abschluß der Sanierung
Berl. Münchn. Tierärztl. Wschr. 85: 191-195 (1972)

Schliesser, Th.
Vorkommen und Bedeutung von Mykobakterien bei Tieren
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 235: 184-194 (1976)

Schliesser Th.
Aktuelle Probleme der Mykobakteriosen (einschließlich Tuberkulose) bei Tieren
Wien. Tierärzt. Mschr. 65, 3: 77-83 (1978)

Schliesser Th., Berger W.
Vergleichende Untersuchungen mit der Frischblut-Schnellagglutination und der Tuberkulin-Kehllappen-Probe bei Hühnern
Monatsheft für Tierheilk. 14: 91-98 (1962)

Schliesser Th., Hiller K.
Eine Frischblut-Schnellagglutination zur Diagnose der Geflügeltuberkulose
Monatsheft für Tierheilk. 13: 201-207 (1961)

Schoop G., Stoll L., Siam M.A
Zur Frage der Spezifität der Frischblutschnellagglutination bei Geflügeltuberkulose
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 74: 297-301 (1967)

Schröder H.-D.
Zur Tuberkuloseprophylaxe bei Zoovögeln
Verh. Ber. XXIII. Intern. Symp. Erkrank. Zootiere, Halle/Saale, 67-71 (1981)

Sonntag H.-G., Warnecke P., Gaden W.
Serologische Differenzierung von Mykobakterien
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 235: 195-201 (1976)

Stoll L., Lucas H.
Vergleichende Untersuchungen zur Diagnose der Geflügeltuberkulose mit Hilfe der Tuberkulin-Kehllappenprobe und der Frischblut-Schnellagglutination
Monatsheft für Tierheilk. 15, 9: 164-169 (1963)

Thoen C.O.
Tuberculosis of Poultry
in: Hofstadt M.S. (ed.)
Diseases of Poultry
Eight' Edition, The Iowa State University Press, Ames, Iowa (1984)

Vizy L., Dózsa I., Pásztor L.
Serologische (Objektträger-Agglutinations-) Untersuchungen an Zoo-Vögeln mit einem aus entkapselten aviären Tuberkelbazillen hergestelltem Antigen
Tijdschr. Diergeneesk. 89, Suppl. 1: 214-219 (1961)

Wayne L.G., Doubek J.R.
Differentiation Among Several Types of Group III Mycobacteria
Amer. Rev. Resp. Dis. 88: 111 (1963)

Wayne L.G., Kubica G.D.
in: Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, Vol.II, Williams and Wilkins, Baltimore, London, Los Angeles, Sydney, 1436-1457 (1986)

Weber A., Schliesser Th., Schultze I. M., Bertelsmann U
Serologische Typendifferenzierung aviärer Mykobakterienstämme isoliert von Schlachtrindern
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 235: 202-206 (1976)

Wiesmann E. (ed.)
Medizinisache Mikrobiologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1982)

Winkle, S.
Mikrobiologische und serologische Diagnostik
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1979)

Winn W.A., Petroff S.A.
Biological Studies of the Tubercle Bacillus.
II. A New Conception of the Pathology of Experimental Avian Tuberculosis with Special Reference to the Disease Produced by Dissociated Variants
J. exp. Med. 57: 239 (1933)

Wolinsky E.
Emendation of Proposed Additional Serotypes of Mycobacteria Determined by Agglutination
Int. J. Syst. Bact. 29: 59 (1979b)

Wolinsky E
Non Tuberculosis Mycobacteria and Associated Diseases
Amer. Rev. Resp. Dis. 119: 107–159 (1979a)

Wolinsky E.
Non Tuberculosis Mycobacteria
Amer. Rev. Resp. Dis. 119: 109–116 (1979b)

Wolinsky E., Schaefer W.B.
Proposed Numbering Scheme for Mycobacterial Serotypes by Agglutination
Int. J. Syst. Bact. 23: 182–183 (1973)

Wolters H.E. (ed.)
Die Vogelarten der Erde
Paul Parey Verlag, Hamburg, Berlin (1975–1982)

Yoder W.D., Schaefer W.B.
Comparison of the Seroagglutination Test with the Pathogenicity Test in the Chicken for the Identification of Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare
Amer. Rev. Resp. Dis. 103: 173–178 (1971)

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. J. Kösters danke ich für die Bereitschaft, meine Doktorarbeit am Institut für Geflügelkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität München erstellen zu dürfen.

Ebenso bin ich Frau Prof. Dr. Dr. habil. H. Gerlach zu großem Dank verpflichtet, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Im einzelnen gilt mein Dank auch

- dem Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen in Südbayern, vor allem Frau Dr. Kalau und den Mitarbeitern des Tbc-Labors für die Bereitstellung von Nährmedien,
- dem Forschunginstitut Borstel, Institut für experimentelle Biologie und Medizin und hier in erster Linie Herrn Dr. K.-H. Schröder für die Überlassung der Laborstämme und die immer wieder durchgeführten Kontrollen der eigenen Ergebnisse,
- den Mitarbeitern des Instituts für Geflügelkrankheiten, insbesondere Herrn Dr. F. Grimm für seine Unterstützung bei der Beschaffung der Tierställe,
- den Doktorandinnen und Doktoranden von 1985-1988 für das kameradschaftliche Verhältnis,
- nicht zuletzt Karin und Stefan.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Neumann
Vorname:	Helmut Walter Heinz
Geburtsdatum:	11.12.1958
Geburtsort:	Neumarkt-St. Veit
Eltern:	Dr. med. vet. Helmut Neumann, praktischer Tierarzt
	Martha Neumann, geb. Fuchs, Hausfrau
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Konfession:	römisch-katholisch

Schulbildung

1965-1969	Volksschule Neumarkt-St. Veit
1969-1980	Ruperti-Gymnasium, Mühldorf
Juni 1980	Allgemeine Hochschulreife

Berufliche Ausbildung

1978-1988	Katastrophenschutz Sanitätsdienst im 3. Sanitätszug, Neumarkt-St.Veit
1980-1986	Studium der Veterinärmedizin Ludwig-Maximilians-Universität, München
Oktober 1986	Staatsexamen
Januar 1987	Approbation
1985-1988	Doktorand am Institut für Geflügelkrankheiten der Tiermedizinischen Fakultät, München